

肢带型肌营养不良症 2A 型临床前期两例临床表型及基因突变分析

李欢 朱瑜龄 利婧 王惊 何若洁 林金福 张成

【摘要】 目的 总结肢带型肌营养不良症 2A 型(LGMD2A 型)临床前期的临床表现、实验室检查、影像学检查、神经电生理学检查、基因检测和家系资料等,为 LGMD2A 型的早期诊断提供临床依据。**方法与结果** 2 例男性患儿,均 4 岁,幼儿园入学体格检查发现血清肌酸激酶升高(分别为正常参考值上限的 25 和 60 倍),运动功能良好,例 1 伴反复多发性皮疹和背部毛发轻度增多的皮肤损害表现,例 2 表现为双侧小腿稍肥大坚实,肌电图和肌肉组织活检均提示肌源性损害,双侧大腿肌肉 MRI 未见明显异常。二代基因测序显示,2 例患儿均存在 *CAPN3* 基因复合杂合突变:例 1 存在复合杂合的错义突变[c.2092C>T (p.Arg606Ser)]和移码突变[c.712delT (p.Phe239LeufsTer14)],2 个突变位点均未见报道;例 2 存在复合杂合的错义突变[c.600C>G(p.Phe200Leu)和 c.619A>G(p.Lys207Glu)],c.600C>G(p.Phe200Leu)突变位点未见报道。Sanger 测序证实二者家系均符合常染色体隐性遗传。2 例患儿明确诊断为 LGMD2A 型,两家系明确诊断为 LGMD2A 型家系。**结论** 无症状高肌酸激酶血症应考虑 LGMD2A 型的可能,本研究增加了人群 *CAPN3* 基因突变的多样性。

【关键词】 肌营养不良,肢带型; 表型; 基因; 突变; 系谱

Analysis on clinical phenotype and gene mutation of two cases of limb - girdle muscular dystrophy type 2A during preclinical stage

LI Huan, ZHU Yu-ling, LI Jing, WANG Liang, HE Ruo-jie, LIN Jin-fu, ZHANG Cheng

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat - sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

LI Huan and ZHU Yu-ling contributed equally to this study

Corresponding author: ZHANG Cheng (Email: zhangch6@mail.sysu.edu.cn)

【Abstract】 Objective To explore the clinical manifestations, laboratory examination, imaging, neurophysiological, genetic test and family data of 2 patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) during the preclinical stage, and to provide clinical data for the early diagnosis of LGMD2A. **Methods and Results** Two 4-year-old male patients presented elevated serum creatine kinase (CK) level (25-fold and 60-fold higher than normal levels, respectively), with good motor function. Case 1 had skin damage performance of repeated multiple rashes and mild increased back hair. In Case 2, the patient's double lower legs were slightly enlarged and firm, and EMG and muscle biopsies showed myogenic damage. There was no abnormality in MRI of double thigh muscles. The next-generation sequencing (NGS) showed that there were complex heterozygous mutations in the *CAPN3* gene in both cases: Case 1 carried missense [c.2092C > T (p.Arg606Ser)] and frameshift [c.712delT (p.Phe239LeufsTer14)] compound heterozygous mutation and none of the mutations have been reported; Case 2 carried compound heterozygous missense mutations [c.600C > G (p.Phe200Leu) and c.619A > G (p.Lys207Glu)], and the former has not been reported.

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2018.07.007

李欢,朱瑜龄并列为本文第一作者

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81471280);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81771359);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81271401);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81601087);广东省广州市 2015 年产产学研专项项目(项目编号:1561000153);广东省科学技术厅 2014 年度公益研究与能力建设专项资金资助项目(项目编号:2014A020212130)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经科

通讯作者:张成(Email:zhangch6@mail.sysu.edu.cn)

Sanger sequencing confirmed that the pedigree was autosomal recessive. The clinical diagnosis was LGMD2A, and their families were diagnosed as LGMD2A pedigree. **Conclusions** The possibility of LGMD2A needs to be considered for asymptomatic high CK. In addition, this study increased the diversity of CAPN3 gene mutations in the population.

【Key words】 Muscular dystrophies, limb-girdle; Phenotype; Genes; Mutation; Pedigree

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81471280, 81771359, 81271401), the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81601087), 2015 Production, Study and Research Special Project of Guangzhou, Guangdong Province, China (No. 1561000153), and Non-Profit Study and Capability Building Special Fund Support Project of Guangdong Provincial Department of Science and Technology, China in the Year 2014 (No. 2014A020212130).

肢带型肌营养不良症(LGMD)是一组以肩带肌、盆带肌和四肢近端肌肉进行性肌无力和肌萎缩为临床特点的常染色体遗传性神经肌肉病,具有较强的遗传异质性。根据遗传方式,可以分为肢带型肌营养不良症 1 型(LGMD1 型,呈常染色体显性遗传)和肢带型肌营养不良症 2 型(LGMD2 型,呈常染色体隐性遗传)。根据基因突变类型,可以分为多种亚型,迄今已知有超过 30 种基因与肢带型肌营养不良症的不同亚型相关。肢带型肌营养不良症临床表型多样,各亚型乃至同一亚型在发病时间和疾病严重程度等方面表现各异,其中肢带型肌营养不良症 2A 型(LGMD2A 型)是最常见亚型之一,占 20%~50%^[1],我国目前尚无相关流行病学资料。LGMD2A 型在我国的病例数相对较少,目前亦无相关临床前期报道。中山大学附属第一医院诊断与治疗 2 例处于临床前期的 LGMD2A 型患儿,总结其临床表现、实验室检查、影像学检查、神经电生理学检查、基因检测和家系资料等,以为 LGMD2A 型的早期诊断提供临床依据。

临床资料

一、临床特征

例 1 男性,4 岁,主因体格检查时发现血清肌酸激酶(CK)升高 6 个月,于 2015 年 11 月 3 日至我院神经科门诊就诊。患儿 6 个月前于幼儿园入学体格检查时发现血清肌酸激酶升高,达 5095 U/L(25~200 U/L),可跑、跳、快速蹲起、独自上 8 楼,运动功能与同龄儿童无明显差异;追问病史,近 1 年反复出现局部皮疹,红色,小片状,位于胸背部和四肢,伴瘙痒,无鳞屑,皮疹反复出现,四季均有,尤以夏季显著,严重时持续数月,曾就诊于我院皮肤科,诊断为湿疹,予对症治疗(具体方案不详),无明显好转,

仍有反复。患儿头胎首产,足月顺产,出生时体重 2.60 kg,无窒息史和产伤史,无围生期特殊疾病病史,1 岁时会独走、说话,生长发育里程碑正常;父母非近亲婚配,身体健康;家族中无类似疾病病史,无遗传性疾病病史。门诊体格检查:高级神经功能和脑神经检查未见明显异常;颈背部毛发增多(图 1),四肢肌力 5 级、肌张力正常,无明显肌萎缩或假性肥大,四肢腱反射正常,无翼状肩胛,可足跟、足尖行走,可迅速蹲起,可连续跳跃,单足跳跃稍笨拙,共济运动协调,感觉系统未见异常,病理征阴性。实验室检查:血清肌酸激酶 3490 U/L,肌酸激酶同工酶(CK-MB)89 U/L(2~24 U/L),乳酸脱氢酶(LDH)503 U/L(114~240 U/L),丙氨酸转氨酶(ALT)91 U/L(1~40 U/L)和天冬氨酸转氨酶(AST)109 U/L(1~37 U/L)。肌电图神经传导速度(NCV)无明显异常。

例 2 男性,4 岁,主因体格检查时发现血清肌酸激酶升高 1 个月,于 2014 年 8 月 8 日首次至我院神经科门诊就诊。患儿 1 个月前于幼儿园入学体格检查时发现血清肌酸激酶升高,达 12 906 U/L,无四肢乏力等不适主诉,跑、跳、蹲起和上楼梯均正常。患儿头胎首产,足月顺产,出生时体重 3.20 kg,无窒息史和产伤史,无围生期特殊疾病病史,13 个月时会独走、说话,生长发育里程碑正常;父母非近亲婚配,身体健康;家族中无类似疾病病史,无遗传性疾病病史。门诊体格检查:颈背部毛发增多,高级神经功能和脑神经检查未见明显异常;四肢肌力 5 级、肌张力正常,双侧腓肠肌稍肥大、坚实,无明显肌萎缩,四肢腱反射正常,无翼状肩胛,步态正常,可迅速蹲起,可连续跳跃,可足尖、足跟行走,共济运动协调,感觉系统未见异常,病理征阴性。实验室检查(2016 年 11 月 30 日):血清肌酸激酶 8501 U/L,肌酸激酶同工酶 139 U/L,乳酸脱氢酶 719 U/L,丙氨酸



图1 入院时例1皮肤损害表现为背部毛发轻度增多 **图2** 例2肌肉组织活检光学显微镜观察所见 ×200 2a 肌纤维轻度大小不等,部分肌纤维小直径化、圆形化 HE染色 2b 大部分肌纤维膜 dystrophin C末端呈阳性、局灶呈弱阳性 免疫组织化学染色(EnVision二步法)

Figure 1 The skin of Case 1 showed mild hypertrichosis of the back. **Figure 2** Muscle biopsy of Case 2 ×200 Mild diameter variation of myofibers had virous sizes, part of them have small diameter and round size (Panel 2a). HE staining Membrane of most myofibers was positive for dystrophin-C, and membrane of a few myofibers was weakly positive (Panel 2b). Immunohistochemical staining (EnVision)

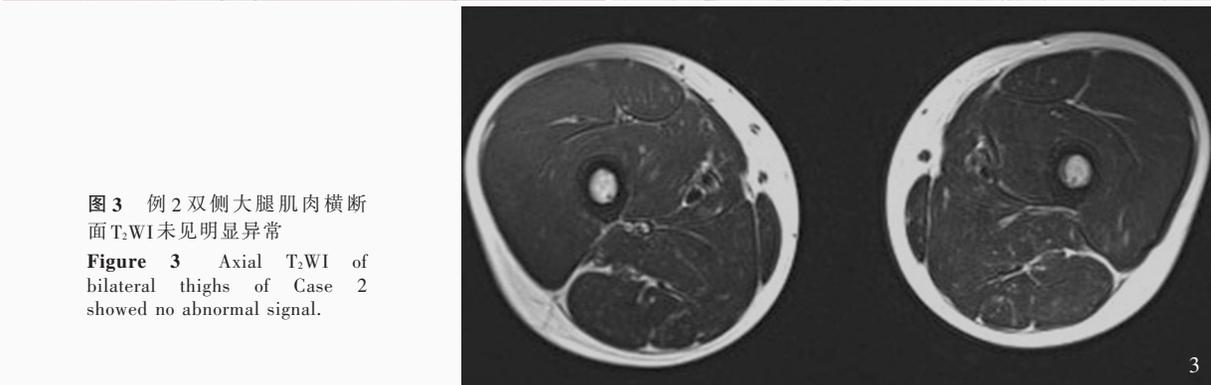
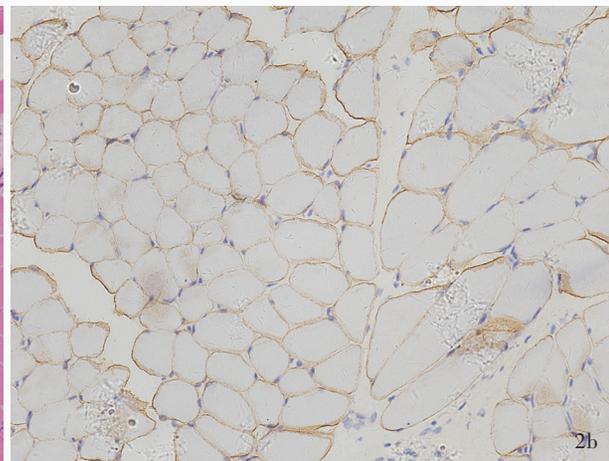
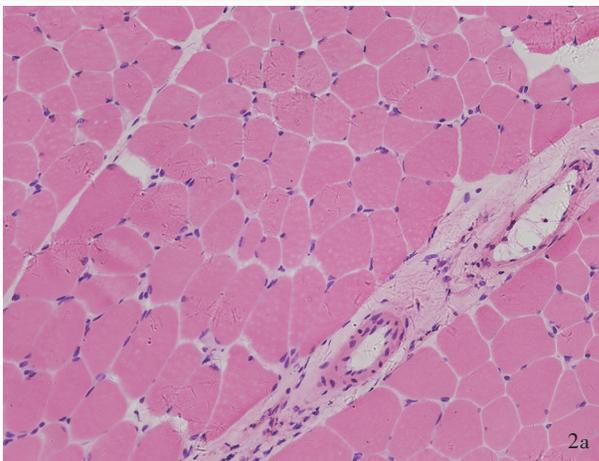


图3 例2双侧大腿肌肉横断面T₂WI未见明显异常

Figure 3 Axial T₂WI of bilateral thighs of Case 2 showed no abnormal signal.

转氨酶 155 U/L 和天冬氨酸转氨酶 151 U/L。心电图和心脏超声未见异常;肌电图提示肌源性损害,神经传导速度未见明显异常。肌肉(右侧股直肌)病理学检查:组织学形态可见肌纤维轻度大小不等,部分肌纤维小直径化、圆形化,呈肌源性损害,但未见特异性形态改变;免疫组织化学染色,大部分肌纤维膜抗肌萎缩蛋白(dystrophin)羧基末端(C末端)呈阳性、局灶呈弱阳性(图2),dystrophin氨基末端(N末端)呈阳性;透射电子显微镜偶见肌纤维萎缩,部分肌原纤维排列紊乱,肌节结构尚完整,可见节

段性肌丝断裂或溶解,不能排除肌营养不良症。双侧大腿肌肉MRI检查(2017年12月6日)未见明显异常(图3)。此后,多次复查血清肌酸激酶,波动于8000~12000 U/L。

二、基因检测

分别抽取2例患儿外周静脉血2 ml,采用二代基因测序(NGS)进行高肌酸激酶血症相关基因外显子捕获测序,2例患儿均存在CAPN3基因复合杂合突变,并采用PROVEAN软件(<http://provean.jcvi.org/index.php>)、PolyPhen-2软件(

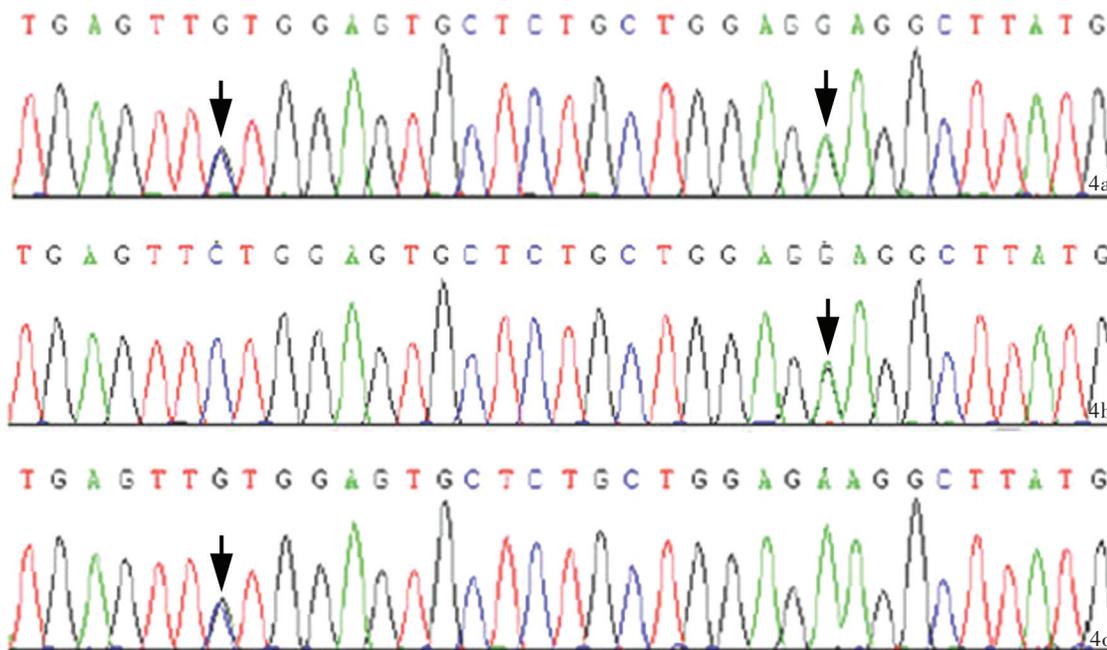


图 4 例 2 及其父母 *CAPN3* 基因检测所见 4a 例 2 存在 c.600C > G (p.Phe200Leu) 和 c.619A > G (p.Lys207Glu) 复合杂合突变 (箭头所示) 4b 例 2 父亲携带 c.619A > G (p.Lys207Glu) 杂合突变 (箭头所示) 4c 例 2 母亲携带 c.600C > G (p.Phe200Leu) 杂合突变 (箭头所示)

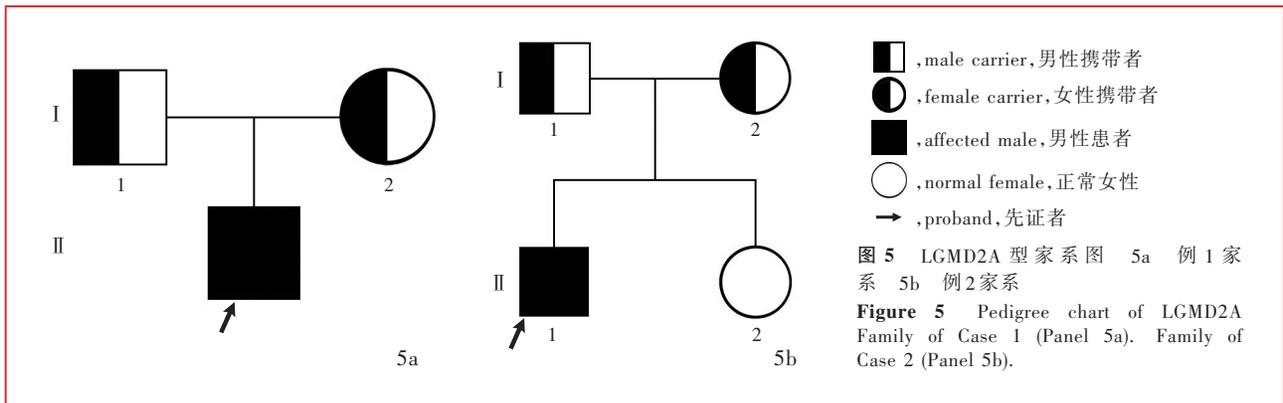
Figure 4 The finding of *CAPN3* gene sequencing for Case 2 and his parents Compound heterozygous mutations c.600C > G (p.Phe200Leu) and c.619A > G (p.Lys207Glu) of *CAPN3* gene was seen in Case 2 (arrows indicate, Panel 4a). Heterozygous mutation c.619A > G (p.Lys207Glu) of *CAPN3* gene was seen in father of Case 2 (arrow indicates, Panel 4b). Heterozygous mutation c.600C > G (p.Phe200Leu) of *CAPN3* gene was seen in mother of Case 2 (arrow indicates, Panel 4c).

harvard.edu/pph2/)、SIFT 软件 (<http://sift.jcvi.org/>)、MutationTaster 软件 (<http://www.mutationtaster.org/>)、M-CAP 软件 (<http://bejerano.stanford.edu/MCAP/>) 等生物信息学软件进行蛋白结构预测,结果显示,例 1 存在 *CAPN3* 基因外显子 19 c.2092C > T (p.Arg606Ser) 突变,为错义突变,蛋白结构预测很可能有害;以及 *CAPN3* 基因外显子 5 c.712delT (p.Phe239LeufsTer14) 突变,为移码突变,其编码的第 239 号密码子由苯丙氨酸变异为亮氨酸,并在新的可读框(ORF)第 14 号密码子终止,上述 2 种突变类型均未见诸报道。进一步采用 Sanger 测序验证基因突变来源,其父携带 *CAPN3* 基因外显子 5 c.712delT (p.Phe239LeufsTer14) 杂合突变,其母携带 *CAPN3* 基因外显子 19 c.2092C > T (p.Arg606Ser) 杂合突变。例 2 存在 *CAPN3* 基因外显子 4 c.600C > G (p.Phe200Leu) 突变,为错义突变,参考在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、人类基因突变数据库(HGMD)、Clinvar 数据库,为新发突变,人群少数等位基因频率(MAF) < 0.000 040,蛋白结构预测可能有害;以及 *CAPN3* 基因外显子 4 c.619A > G (p.

Lys207Glu) 突变,为错义突变(图 4a),有文献报道该位点其他氨基酸变异 (p.Lys207Thr) 可能与 LGMD2A 型发病相关^[2]。进一步采用 Sanger 测序验证基因突变来源,其父携带 *CAPN3* 基因外显子 4 c.619A > G (p.Lys207Glu) 杂合突变,其母携带 *CAPN3* 基因外显子 4 c.600C > G (p.Phe200Leu) 杂合突变(图 4b,4c)。

三、诊断、治疗及转归

结合临床表现、实验室检查、神经电生理学、肌肉影像学 and 基因检测结果,2 例患儿明确诊断为 LGMD2A 型,两家系明确诊断为 LGMD2A 型家系(图 5),均符合常染色体隐性遗传。例 1 予艾地苯醌(申维)30 mg/次、3 次/d,黄芪颗粒 4 g/次、2 次/d,肌苷片 0.10 g/次、3 次/d 口服,随访 3 年,现 7 岁,运动功能无明显降低,但跑步较同龄儿童稍慢;最近 1 次随访(2017 年 8 月 1 日)时反复性皮炎处于恢复期,右侧大腿后外侧残留片状红色皮疹,表面糜烂,有少许渗液(图 6);随访期间多次复查血清肌酸激酶,波动于 3000 ~ 6000 U/L,心电图和心脏超声未见明显异常。例 2 予艾地苯醌 30 mg/次、3 次/d,黄芪颗



粒 4 g/次、2 次/d，通塞脉 0.35 g/次、3 次/d 口服，随访 4 年，现 8 岁，运动功能无明显降低，但跑步较同龄儿童稍慢，体格检查双侧膝腱反射阳性，余体格检查较前无明显差异。

讨 论

本研究报道 2 例处于临床前期的 LGMD2A 型患儿，其中例 1 伴反复皮肤损害，目前尚未见诸报道；同时报道 CAPN3 基因 3 种新发致病性突变，即 c.2092C > T (p.Arg606Ser)、c.712delT (p.Phe239LeufsTer14)、c.600C > G (p.Phe200Leu)，增加了人群 CAPN3 基因突变的多样性。

LGMD2A 型系定位于染色体 15q15 ~ q21 的 CAPN3 基因缺陷所致，CAPN3 基因包含 24 个外显子，编码相对分子质量为 94×10^3 的 calpain 3 蛋白。Calpain 3 蛋白是一种非溶酶体、钙依赖性蛋白酶。肌营养不良症通常与编码结构蛋白的基因缺陷相关，LGMD2A 型是首个报道的与蛋白水解酶基因缺陷有关的肌营养不良症^[3]。

LGMD2A 型发病年龄 2 ~ 55 岁、平均 17.9 岁，自

发病至丧失行走能力 4 ~ 29 年、平均 15.2 年^[4]，通常以对称性、缓慢进展的近端肌无力、肌萎缩和踝关节挛缩为典型临床表现，较少累及呼吸肌和心肌。青少年期以跑步障碍、趋向足尖行走、翼状肩胛等为首发症状，缓慢进展。LGMD2A 型临床表现具有高度异质性，不同患者发病年龄、疾病进展、病情严重程度等存有差异，部分患者即使携带相同基因突变，其临床表型亦可差异较大，尤其是错义突变引起的临床表型差异较大，难以预测。

本研究报道 2 例表现为 4 岁前无症状高肌酸激酶血症的学龄前期男童病例。因无临床症状，但有亚临床的血清肌酸激酶显著升高，肌电图呈肌源性损害，故临床疑诊肌肉病，倾向于肢带型肌营养不良症，具体亚型尚不明确。经二代基因测序，2 例患儿均存在 CAPN3 基因复合杂合突变，例 1 为错义突变/无功能突变 [c.2092C > T (p.Arg606Ser)]，生物信息学分析为很可能有害突变，而移码突变 [c.712delT (p.Phe239LeufsTer14)] 为有害突变；进一步经 Sanger 测序证实，其父母均为携带者，该家系符合常染色体隐性遗传，此 2 种突变目前尚未报道。例 2 为 2 种错义突变，其中 c.619A > G (p.Lys207Glu) 位点的其他氨基酸变异已见诸报道与 LGMD2A 型相关，而 c.600C > G (p.Phe200Leu) 为新发突变，但人群携带率较低，生物信息学分析为可能有害突变；进一步经 Sanger 测序证实，其父母均为携带者，该家系符合常染色体隐性遗传，存在共分离现象。

Calpain 3 蛋白可分为 4 个结构域 (I ~ IV 区)，其中 II 和 IV 区分别为具有重要功能的半胱氨酸蛋白酶和钙离子结合区结构域，且二者具有与其他 calpain 蛋白成员同源的序列^[2]。本研究的 4 个突变位点均位于 calpain 3 蛋白保守的重要功能区，其中 c.2092C > T (p.Arg606Ser) 位于 IV 区，余 3 个突变位

点位于 II 区,与既往文献报道的热点突变点分布规律相符^[3]。本研究 2 例患儿的 *CAPN3* 基因突变根据美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 遗传变异分类标准与指南^[5]均判定为致病性突变。例 2 肌肉组织活检存在轻度肌肉病改变,肌电图提示肌源性损害。此外,2 例患儿在 3~4 年的随访中,出现轻微下肢近端肌无力表现(跑步较同龄儿童稍慢,其中例 2 双侧膝腱反射降低)。结合临床表现、实验室检查、肌肉影像学、神经电生理学和基因检测结果,明确诊断为 LGMD2A 型。

LGMD2A 型基因型与临床表型的联系十分复杂,*CAPN3* 基因缺陷大多为错义突变(60%),并且多为复合杂合突变,c.550delA 是 LGMD2A 型的热点突变^[6-7]。携带 2 种无功能突变的患者通常有严重的临床表型,发病年龄早,疾病进展迅速;携带 2 种错义突变或错义突变/无功能突变的患者其临床表型尚不可预测,尽管纯合错义突变患者临床症状较轻微,发病年龄晚,病情进展缓慢^[8];错义突变患者其临床表型的差异可能与突变位点处于蛋白不同重要程度的功能区有关^[2,8]。LGMD2A 型临床表型具有高度异质性,即使是有相同基因突变的同胞兄弟姊妹亦可能有不同的临床表型。本研究 2 例患儿均存在 *CAPN3* 基因复合杂合突变,例 1 为复合杂合的错义突变和移码突变,例 2 为复合杂合的错义突变,目前尚无明显的肌萎缩和肌无力表现,但二者年龄较小(7 和 8 岁),低于 LGMD2A 型的平均发病年龄,目前尚无法预测其病情严重程度。

LGMD2A 型的诊断主要依靠临床表型及蛋白和分子诊断等。LGMD2A 型受累肌肉有一定趋向性,可以为诊断提供依据。髋部内收肌群、髋部伸肌群和大腿后侧肌群(臀大肌、半膜肌和股二头肌)肌无力和肌萎缩在 LGMD2A 型的临床表现和影像学检查上均较突出,肌肉影像学改变在疾病早期即可出现^[9-10]。此外,关节挛缩多见于踝关节,亦可见于髋关节、肘关节、脊柱和指关节,是 LGMD2A 型的另一典型临床表现,可发生于疾病早期,亦可以为 LGMD2A 型的诊断提供线索^[11]。但本研究 2 例患儿均未出现关节挛缩,可能原因是尚处于疾病早期阶段。Calpain 3 蛋白测定可以作为诊断 LGMD2A 型的重要依据,但是由于其在体外极不稳定,易发生快速自溶降解,同时其他肢带型肌营养不良症亚型如 LGMD2B 型和 LGMD2J 型责任蛋白 dysferlin 和肌联蛋白(titin)功能缺陷可以导致 calpain 3 蛋白继发

性减少或缺失,从而导致假阳性结果^[12-13]。亦有 25%~30% 的患者 calpain 3 蛋白水平正常,但蛋白功能缺失,导致假阴性结果^[14-15]。LGMD2A 型的临床表型和实验室检查通常特异性较低。基因检测是 LGMD2A 型诊断的“金标准”,二代基因测序等技术的普及和应用进一步提高基因突变检出率。LGMD2A 型临床前期缺乏典型临床表现或症状较轻微时,基因检测对诊断尤为重要。

LGMD2A 型临床前期表现为无症状高肌酸激酶血症(达正常参考值上限的 5~80 倍),通常见于儿童或青少年,可持续数年,随着肌萎缩的进展,血清肌酸激酶降低^[8]。本研究 2 例患儿首次就诊均表现为无症状高肌酸激酶血症,例 1 血清肌酸激酶达正常参考值上限的 17~30 倍,例 2 达 50~60 倍,表明肌肉损害处于活动期,与文献报道相符^[8]。临床实践中,越来越多的神经肌肉病首诊原因是高肌酸激酶血症,缺乏肌肉病临床表现或症状较轻微,因此对诊断的要求越来越高。本研究 2 例患儿首诊时均为学龄前期男童,这一群体高肌酸激酶血症的最常见原因是 Duchenne 型肌营养不良症(DMD)和 Becker 型肌营养不良症(BMD),其次为肢带型肌营养不良症,前两者血清肌酸激酶可达正常参考值上限的 25~200 倍,后者达 1~80 倍^[16]。Duchenne 型肌营养不良症多于 3~5 岁发病,以进行性加重的近端肌无力和肌萎缩以及双侧腓肠肌假性肥大为典型临床表现,发病早,疾病进展迅速,多于 12 岁丧失行走能力;而 Becker 型肌营养不良症发病年龄较晚(3~21 岁、平均 11 岁),疾病进展缓慢,大多数患者 30 余岁时仍有行走能力,部分患者直至成年期仍处于临床前期^[17],临床表现尤其是临床前期或疾病早期阶段与 LGMD2A 型相似,应注意鉴别。临床实践中,约 17% 临床诊断为肢带型肌营养不良症的患者最终诊断为 Dystrophin 肌病,而 7% 的 Dystrophin 肌病患者误诊为 LGMD2A 型^[7,18]。

本研究 2 例患儿均为男性,首诊时均 4 岁,均表现为无症状高肌酸激酶血症(分别为正常参考值上限的 25 和 60 倍),应注意与 Becker 型肌营养不良症相鉴别,尤其是例 2 有双侧小腿腓肠肌肥大坚实的临床表现,这一特征是 Duchenne 型肌营养不良症/Becker 型肌营养不良症的典型临床表现,尽管亦可见于其他神经肌肉病如 LGMD2D 型和 LGMD2I 型,但较少见于 LGMD2A 型。对于临床前期的 Becker 型肌营养不良症和 LGMD2A 型,某些实验室指标可

能存有差异,可资鉴别。近年来,随着肌肉 MRI 的普及和应用,越来越多的神经肌肉病受累肌肉模式被发现,肌肉 MRI 可以为多种神经肌肉病的诊断提供一定线索。Becker 型肌营养不良症与 LGMD2A 型的肌肉 MRI 表现有一定差异。大腿水平,Becker 型肌营养不良症患者臀中肌、臀大肌、大收肌、半膜肌、股二头肌长头、股四头肌股内侧肌和股外侧肌、股中间肌受累明显,这种肌肉受累在临床前期患者中亦可观察到。LGMD2A 型主要累及大腿后侧肌群,与 Becker 型肌营养不良症不同的是,前者股四头肌相对保留尤其是股外侧肌,仅病情严重时方受累^[11,19];小腿水平,中至重度腓肠肌内侧受累可在 LGMD2A 型患者中早期持续存在,腓肠肌外侧相对保留,而 Becker 型肌营养不良症患者在病情较轻时腓肠肌保留或受累程度较轻,且腓肠肌内外侧均受累^[11,19];提示肌肉 MRI 可以为临床前期或症状较轻的 LGMD2A 型和 Becker 型肌营养不良症提供鉴别诊断依据。然而本研究例 2 双侧大腿肌肉 MRI 无明显异常,鉴于总结 LGMD2A 型肌肉 MRI 特点的研究所纳入对象均 > 10 岁^[11],较例 2 接受 MRI 检查的年龄大,考虑例 2 双侧大腿肌肉 MRI 无明显异常与其接受 MRI 检查年龄较小、肌肉受累 MRI 表现尚未出现有关。此外,肌肉组织活检 dystrophin 免疫组织化学染色是临床诊断与鉴别诊断 Duchenne 型肌营养不良症/Becker 型肌营养不良症与其他肌营养不良症的重要方法。Becker 型肌营养不良症患者 dystrophin 表达波动于 50% ~ 100%,其他肌肉病如 Sarcoglycan 肌病可出现 dystrophin 继发性减少^[20]。本研究例 2 肌肉组织活检仅见轻度肌肉病表现,dystrophin 大部分呈阳性、局灶呈弱阳性,仍无法排除 Becker 型肌营养不良症。Becker 型肌营养不良症多见心肌受累,约 50% 患者可出现独立于骨骼肌的心肌受累,多以右心室功能异常首发,随疾病进展逐渐累及左心室^[21]。约 75% 的 Becker 型肌营养不良症患者有心电图异常,表现为高 R 波, V₁ 导联 RS 波增多,左心前区导联深 Q 波,不完全传导阻滞等,这种异常在高肌酸激酶血症临床前期或症状较轻微时即出现^[21],应注意密切观察心肌情况并早期干预,尽管也有个别报道 LGMD2A 型患者有严重的心脏受累表现^[22-23],但 LGMD2A 型较少累及心肌。本研究 2 例患儿均未见心电图和心脏超声异常,一系列实验室检查亦无特异性,最终明确诊断依靠基因检测,基因检测是 LGMD2A 型诊断的“金标准”,对

临床前期的诊断尤为重要。对于无症状高肌酸激酶血症患者,应考虑 LGMD2A 型的可能。

本研究例 1 除出现无症状高肌酸激酶血症外,还伴湿疹样皮疹和背部毛发增多的皮肤损害表现,尤其是其突出的皮疹,初诊时应排除皮炎(DM)的可能,但皮疹呈反复性,持续时间最多数月,不符合皮炎的持续性皮疹表现,且无皮炎典型的 Gottron 丘疹、Gottron 征(指关节有紫红色斑)、Heliotrope 疹(眶周水肿性淡紫红色斑疹),结合基因检测结果,排除皮炎,明确诊断为 LGMD2A 型。湿疹样皮疹与 CAPN3 基因缺陷是否有关,或仅是共病关系,目前尚不明确。皮肤损害在神经肌肉病中并不少见,肌营养不良症中皮肤损害表现最常见的是 LGMD2Q 型,其皮肤损害表现为大疱性表皮松解症,与 PLEC 基因缺陷有关^[24];此类患者通常有手部水疱、指/趾甲营养不良和白色丘疹样皮肤损害等。近年研究显示,CAPN3 基因相关肌病发病机制可能与嗜酸性粒细胞有关,嗜酸性粒细胞在骨骼肌的浸润可见于 LGMD2A 型患者,嗜酸性肌炎认为是 LGMD2A 型的病理生理学表现之一,而短暂性外周血嗜酸性粒细胞增多症状仅见于儿童肢带型肌营养不良症患者,成年患者则无外周血嗜酸性粒细胞增多^[25-26]。嗜酸性粒细胞在 LGMD2A 型患者中是否有除肌肉和外周血外其他系统的浸润,目前尚无相关报道。嗜酸性粒细胞可能参与湿疹的发病与转归,实验室检查多可见外周血嗜酸性粒细胞增多。据此大胆假设,该例患儿湿疹样皮疹可能与 CAPN3 基因缺陷有关,尚待进一步检测外周血嗜酸性粒细胞数目和皮肤组织活检明确皮疹性质等,进一步探究二者是否有联系。此外,例 1 患儿除皮疹外,还可见背部毛发增多,这种临床表现可见于多种神经肌肉病,如多毛症是 Leigh 综合症的典型临床表现,该例患儿多毛表现并不突出,意义不明确。目前尚无 LGMD2A 型皮肤损害的相关报道。本研究首次报道 LGMD2A 型伴湿疹样皮疹和背部毛发增多的皮肤损害表现,尽管目前证据不能表明这些皮肤损害表现对 LGMD2A 型是否有特异性。

本研究回顾分析 2 例表现为无症状高肌酸激酶血症的 LGMD2A 型患儿的临床资料,通过对经基因检测明确诊断的 LGMD2A 型患儿病情演变的精神临床观察,以提高早期诊断 LGMD2A 型的能力,并可进行基因型-临床表型分析,以提高临床诊断与鉴别诊断 LGMD2A 型的能力。

参 考 文 献

- [1] Bushby KM, Beckmann JS. The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the non - sarcoglycan limb - girdle muscular dystrophies[J]. *Neuromuscul Disord*, 2003, 13:80-90.
- [2] Kramerova I, Beckmann JS, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772:128-144.
- [3] Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, Belsito A, Totaro A, Saccone V, Topaloglu H, Nascimbeni AC, Fulizio L, Broccolini A, Canki-Klain N, Comi LI, Nigro G, Angelini C, Nigro V. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes [J]. *J Med Genet*, 2005, 42:686-693.
- [4] Wang CH, Liang WC, Minami N, Nishino I, Jong YJ. Limb-girdle muscular dystrophy type 2A with mutation in CAPN3: the first report in Taiwan[J]. *Pediatr Neonatol*, 2015, 56:62-65.
- [5] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. *Genet Med*, 2015, 17:405-424.
- [6] Dorobek M, Ryniewicz B, Kabzińska D, Fidziańska A, Styczyńska M, Hausmanowa - Petrusiewicz I. The frequency of c.550delA mutation of the CAPN3 gene in the Polish LGMD2A population[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19:637-640.
- [7] Georgieva B, Todorova A, Tournev I, Mitev V, Plageras P, Kremensky I. 550delA mutation in the calpain 3 (CAPN3) gene: DMD/BMD, SMA, or LGMD2A[J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 136A:399-400.
- [8] Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: the yield and the pitfalls [J]. *Muscle Nerve*, 2015, 52:163-173.
- [9] Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, Feingold N, Feingold J, Mignard D, de Ubeda B, Collin H, Tome FM, Richard I, Beckmann J. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy: clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island[J]. *Brain*, 1996, 119(Pt 1):295-308.
- [10] ten Dam L, van der Kooij AJ, van Wattingen M, de Haan RJ, de Visser M. Reliability and accuracy of skeletal muscle imaging in limb-girdle muscular dystrophies[J]. *Neurology*, 2012, 79: 1716-1723.
- [11] Mercuri E, Bushby K, Ricci E, Birchall D, Pane M, Kinali M, Allsop J, Nigro V, Sáenz A, Nascimbeni A, Fulizio L, Angelini C, Muntoni F. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures[J]. *Neuromuscul Disord*, 2005, 15:164-171.
- [12] Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KM. Secondary reduction in calpain-3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies)[J]. *Neuromuscul Disord*, 2000, 10:553-559.
- [13] Haravuori H, Vihol A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchand S, Voit T, Labeit S, Somer H, Peltonen L, Beckmann JS, Udd B. Secondary calpain-3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene[J]. *Neurology*, 2001, 56:869-877.
- [14] Fanin M, Nascimbeni A, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric - Petrusa M, Angelini C. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163:1929-1936.
- [15] Milic A, Daniele N, Löchmüller H, Mora M, Comi GP, Moggio M, Noulet F, Walter MC, Morandi L, Poupiot J, Roudaut C, Bittner RE, Bartoli M, Richard I. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay[J]. *Neuromuscul Disord*, 2007, 17:148-156.
- [16] Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies: international collaborations for translational research [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12:294-309.
- [17] Anthony K, Cirak S, Torelli S, Tasca G, Feng L, Arechavala-Gomez V, Armaroli A, Guglieri M, Straathof CS, Verschuuren JJ, Aartsma-Rus A, Helderma-van den Enden P, Bushby K, Straub V, Sewry C, Ferlini A, Ricci E, Morgan JE, Muntoni F. Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials[J]. *Brain*, 2011, 134:3547-3559.
- [18] Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, Nonaka I, Sugita H, Arahata K. The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population[J]. *Neurology*, 1991, 41:1491-1496.
- [19] Tasca G, Iannaccone E, Monforte M, Masciullo M, Bianco F, Laschena F, Ottaviani P, Pelliccioni M, Pane M, Mercuri E, Ricci E. Muscle MRI in Becker muscular dystrophy [J]. *Neuromuscul Disord*, 2012, 22:100-106.
- [20] Shaboodien G, Watkins DA, Pillay K, Beighton P, Heckmann JM, Mayosi BM. Limb-girdle weakness in a marfanoid man: distinguishing calpainopathy from Becker's muscular dystrophy [J]. *Pract Neurol*, 2015, 15:152-154.
- [21] Mavrogeni SI, Markousis - Mavrogenis G, Papavasiliou A, Papadopoulos G, Kolovou G. Cardiac involvement in Duchenne muscular dystrophy and related dystrophinopathies[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1687:31-42.
- [22] Dirik E, Aydin A, Kurul S, Sahin B. Limb girdle muscular dystrophy type 2A presenting with cardiac arrest [J]. *Pediatr Neurol*, 2001, 24:235-237.
- [23] Hashiguchi S, Adachi K, Inui T, Arii Y, Kashiwagi S, Saito M, Kagawa N, Kawai H. A clinicopathological investigation of two autopsy cases of calpainopathy (LGMD2A) [J]. *Brain Nerve*, 2014, 66:1097-1102.
- [24] Yin J, Ren Y, Lin Z, Wang H, Zhou Y, Yang Y. Compound heterozygous PLEC mutations in a patient of consanguineous parentage with epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy and diffuse alopecia[J]. *Int J Dermatol*, 2015, 54:185-187.
- [25] Krahn M, Goicoechea M, Hanisch F, Groen E, Bartoli M, Pécheux C, Garcia-Bragado F, Leturcq F, Jeannot PY, Lohrinus JA, Jacquemont S, Strober J, Urtizberea JA, Saenz A, Bushby K, Lévy N, Lopez de Munain A. Eosinophilic infiltration related to CAPN3 mutations: a pathophysiological component of primary calpainopathy[J]? *Clin Genet*, 2010, 80:308-402.
- [26] Schröder T, Fuchss J, Schneider I, Stoltenburg - Didinger G, Hanisch F. Eosinophils in hereditary and inflammatory myopathies[J]. *Acta Myol*, 2013, 32:148-153.

(收稿日期:2018-06-19)

本期广告目次

恩必普(石药集团恩必普药业有限公司) 封二
 申捷(齐鲁制药有限公司) 封四