

核黄素反应性脂质沉积性肌病治疗前后肌肉病理比较:一例报告并文献复习

陈定邦 吴超 冯黎 莫桂玲 廖冰 刘大伟 吴金浪 吴强 李洵桦

【摘要】 目的 观察核黄素反应性脂质沉积性肌病治疗前后肌肉组织变化。方法 对 1 例核黄素反应性脂质沉积性肌病患者随访 10 年,比较左卡尼汀治疗前后临床表现和肌肉病理变化,并行电子转移黄素蛋白脱氢酶(*ETFDH*)基因突变分析。结果 患者具有脂质沉积性肌病的主要表现,四肢乏力、抬头费力、吞咽困难等;血清肌酸激酶和乳酸脱氢酶水平明显升高;肌电图呈肌源性损害;肌肉病理观察可见大量脂质沉积;*ETFDH* 基因突变分析呈杂合突变。经左卡尼汀治疗数年后恢复正常生活和工作,肌肉组织活检呈正常形态。结论 脂质沉积性肌病患者经适当治疗后,不仅临床症状可完全缓解,而且可逆转肌肉病理改变。

【关键词】 脂质贮积病; 电子转移黄素蛋白质类; 肉碱; 突变

Comparison of muscle pathology in riboflavin - responsive lipid storage myopathy before and after treatment: one case report and review of literature

CHEN Ding-bang¹, WU Chao¹, FENG Li¹, MO Gui-ling², LIAO Bing³, LIU Da-wei³, WU Jin-lang⁴, WU Qiang⁴, LI Xun-hua¹

¹Department of Neurology, ²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

³Guangzhou Kingmed Diagnostic Center Co. Ltd, Guangzhou 510330, Guangdong, China

⁴Department of Electron Microscope, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: LI Xun-hua (Email: lxh59xyh@sina.com)

【Abstract】 **Objective** To study the muscular pathological characteristics in riboflavin-responsive lipid storage myopathy before and after treatment. **Methods** A 10-year follow-up visit was made on a patient with riboflavin-responsive lipid storage myopathy, and the changes of serum enzymes, and both histological and ultrastructural data acquired by general muscular pathology, immunohistochemistry and electron microscope were observed before and after treatment by using levocarnitine. *ETFDH* gene were detected in the patient and his family. **Results** The patient presented limb weakness, difficulty in raising head and dysphagia, which were typical clinical features of lipid storage myopathy (LSM). The serum creatine kinase (CK) level and lactic dehydrogenase (LDH) level elevated evidently. EMG showed myogenic abnormality, and muscular pathology revealed numerous lipid droplets deposited in the fibers. ATPase staining showed predominant atrophy of type I fibers and relative increasing of the portion of type II fibers. Modified Gomori trichrome (MGT) staining did not observe ragged red fibers. Immunohistochemical staining showed positive expression of dystrophin. Sultan III staining revealed multiple vacuolated myofibers. *ETFDH* gene test showed two heterozygous mutations in the patient. After treating with levocarnitine for several years, the patient could live a normal life. The muscular pathological result returned to normal. **Conclusions** After appropriate therapy, patient with lipid storage myopathy can not only gain complete remission clinically, but also the reversion of lesion pathologically.

【Key words】 Lipidoses; Electron-transferring flavoproteins; Carnitine; Mutation

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81171070).

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.06.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81171070)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经内科(陈定邦、吴超、冯黎、李洵桦),病理科(廖冰、刘大伟); 510330 广州金域医学检验中心有限公司(莫桂玲);510080 广州,中山大学中山医学院电子显微镜室(吴金浪、吴强)

通讯作者:李洵桦(Email:lxh59xyh@sina.com)

脂质沉积性肌病(LSM)是遗传性肌肉组织脂肪代谢障碍性肌病,主要病因是脂质代谢通路上的某些酶或肉碱缺乏,影响肌细胞脂质代谢,导致脂肪在肌纤维内异常沉积^[1]。我国的脂质沉积性肌病大多由电子转移黄素蛋白脱氢酶(*ETFDH*)基因突变所致^[2-4],又称核黄素反应性脂质沉积性肌病,属于多种酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症(MADD)的一种,亦称戊二酸尿症 II 型(GA II)。我们报告 1 例经肌肉病理和基因突变分析诊断明确的核黄素反应性脂质沉积性肌病患者,并结合相关文献分析其临床特点、治疗效果和治疗前后肌肉组织病理变化。

病历介绍

患者 男性,24 岁。主诉进行性四肢乏力,伴消瘦 1 年余,于 2003 年 11 月 6 日(13 岁时)首次入院。患者自 2002 年 10 月(12 岁时)开始出现进行性四肢消瘦、乏力,初期表现为长距离行走后疲劳,逐渐出现上楼或奔跑显著乏力;至 2003 年,行走困难加重需扶行,咀嚼困难,间断饮水呛咳;上抬手臂和蹲起动作完成困难,无肌肉疼痛。既往体格健康,足月顺产,4 个月会抬头、1 岁会走路。父母非近亲婚配,双胞胎姐姐均身体健康。入院后体格检查:高级神经活动正常,眼球各向活动正常,构音清晰,无饮水呛咳,转颈、耸肩乏力,未见舌肌震颤和萎缩;四肢肌萎缩,以近端明显,未见假性肥大;四肢近端肌力 4 级、远端 5 级;腱反射消失;病理征未引出,感觉系统无异常。实验室检查:血清肌酸激酶(CK)559 U/L(25~200 U/L)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)89 U/L(<24 U/L)、乳酸脱氢酶(LDH)1182 U/L(114~240 U/L)。肌电图呈肌源性损害。临床拟诊:多发性肌炎。予地塞米松 10 mg/d 静脉滴注,连续治疗 7 d 后症状有所好转出院。继续服用泼尼松 40 mg/d,连续治疗 2 周,剂量递减 2 周后停药,患者可独立行走,生活自理,未再继续服药。

患儿 15 岁时因上述症状反复,进行性消瘦,行走和颈肌无力加重,伴轻微活动后心悸、气喘 2 月余,于 2005 年 3 月 2 日再次入院。体格检查:一般内科系统检查未见异常。神经系统专科检查双侧咬肌、颞肌萎缩,咬合力明显减弱,双侧胸锁乳突肌、斜方肌萎缩,抬头不能,转颈、耸肩肌力减弱;四肢肌萎缩,以近端明显,呈翼状肩胛,无假性肥大;四肢近端肌力 3 级、远端 4 级,肌张力明显降低;Gower 征阳性,呈摇摆步态;四肢腱反射除膝反射外均减

弱。实验室检查:血清肌酸激酶水平为 696 U/L、肌酸激酶同工酶 59 U/L、乳酸脱氢酶 2163 U/L;运动前血清乳酸 0.70 mmol/L(0.90~2.30 mmol/L)、运动后 7.10 mmol/L、运动后休息 5 min 0.90 mmol/L。临床拟诊:多发性肌炎,行股四头肌组织活检术。光学显微镜观察显示,肌纤维呈散在性萎缩,可见个别肌纤维坏死、再生,肌纤维内可见大小不等空泡变性,间质内可见明显的吞噬细胞浸润;ATP 酶染色以 I 型纤维萎缩为主,II 型纤维比例相对增加(图 1);改良 Gomori 三色染色未见破碎红纤维;免疫组织化学染色抗肌萎缩蛋白(dystrophin)表达阳性(图 2);苏丹 III 染色可见空泡变性的肌纤维(图 3)。电子显微镜观察显示,少部分肌纤维轻度萎缩,肌节消失,核膜皱褶、不清;其间可见大量脂肪滴堆积,新生肌纤维形成,线粒体、肌质网和糖原轻度增加;未见炎性细胞浸润(图 4)。最终病理诊断为脂质沉积性肌病。予以左卡尼汀 1 g/d 静脉滴注、维生素 B₂ 10 mg(3 次/d)口服,治疗 5 d 后症状好转出院。出院后继续服用维生素 B₂ 10 mg(3 次/d),2 周后停药,间断服用左卡尼汀(1 g/d)。

2006 年 8 月 19 日因不完全性肠梗阻在当地医院行部分坏死小肠切除术。术后进食较少,出现营养不良和轻度贫血。2008 年 6 月 25 日因进行性进食困难、肌无力、气短 15 d 至我院急诊,临床拟诊:脂质沉积性肌病合并肺感染。入院后因呼吸困难加重行气管切开呼吸机辅助通气,予左卡尼汀 1 g(2 次/d)静脉滴注,连续治疗 2 周后剂量减至 1 g/d,连续治疗 9 d,期间辅助维生素 B₂ 10 mg(3 次/d)口服,同时联合抗感染药物治疗。呼吸系统症状改善,脱离呼吸机,拔除气管插管出院。出院后一直遵医嘱服用左卡尼汀[初始剂量 1 g(2 次/d)],未继续服用维生素 B₂。2 年后自觉症状完全消失,可以正常生活和工作,自行将左卡尼汀剂量减至 1 g/d 或 1 g(隔日一次),仍可正常生活和工作。2013 年下半年因胃部不适停用左卡尼汀,症状未复发。2014 年 1 月开始服用维生素 B₂ 10 mg(3 次/d),至今可正常生活和工作。2014 年 1 月复查血清肌酶谱正常,股四头肌组织活检未见结构异常的肌纤维,油红 O 染色和电子显微镜观察未见脂肪滴堆积(图 5,6)。

ETFDH 基因学检测发现 2 个杂合突变,分别为 c.250G>A, p.Ala84Thr(来自母亲)和 c.1694T>C, p.Val565Ala(来自父亲);其双胞胎姐姐未检测到上述突变。其中, c.250G>A 突变为错义突变(翻译产物

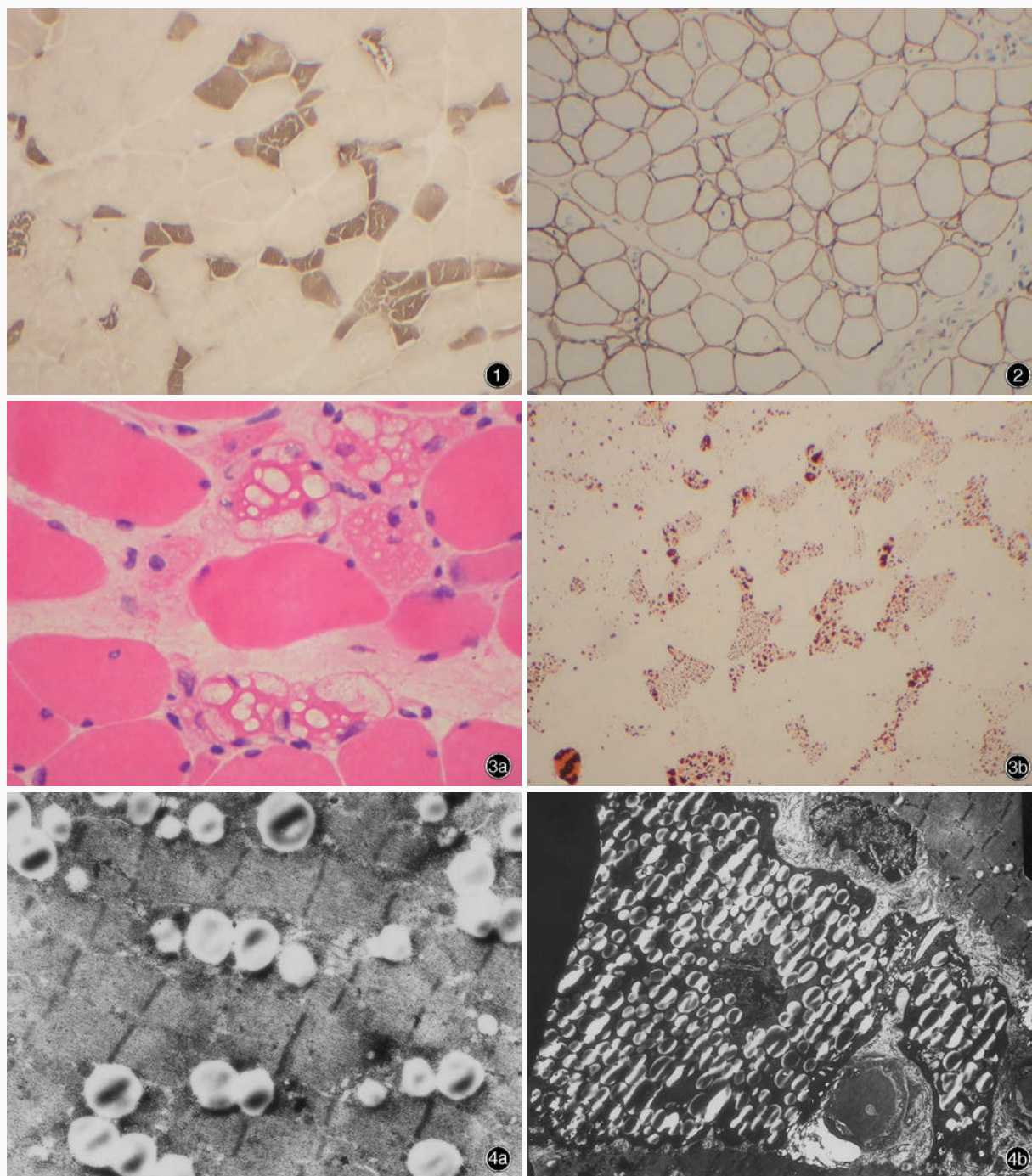


图 1 光学显微镜观察显示, I 型纤维萎缩为主, II 型纤维比例相对增加 ATP 酶染色 $\times 400$ 图 2 光学显微镜观察显示, 肌细胞 dystrophin 蛋白表达阳性 免疫组织化学染色(EnVision 二步法) $\times 400$ 图 3 光学显微镜下可见大量空泡变性的肌纤维 $\times 400$ 3a HE 染色 3b 苏丹 III 染色 图 4 电子显微镜观察显示大量脂肪滴呈“串珠”样堆积 枸橼酸铅、醋酸铀双重染色 4a $\times 25\ 600$ 4b $\times 9600$

Figure 1 Optical microscopy showed atrophy predominantly in type I fibers and relative increase in the portion of type II fibers. ATPase staining $\times 400$ **Figure 2** Optical microscopy showed positive labeling of dystrophin. Immunohistochemical staining (EnVision) $\times 400$ **Figure 3** Optical microscopy showed multiple vacuolated myofibers. $\times 400$ HE staining (Panel 3a). Sulfan III staining (Panel 3b). **Figure 4** Electron microscope showed abundant beaded deposition of lipid droplets. Lead citrate and uranyl acetate double staining $\times 25\ 600$ (Panel 4a). $\times 9600$ (Panel 4b).

第 84 位氨基酸由丙氨酸突变为苏氨酸), 其致病性已被反复报道^[5], 也是中国南方人群核黄素反应性

脂质沉积性肌病的热点突变^[4]。c.1694T>C 突变为错义突变(翻译产物第 565 位氨基酸由缬氨酸突

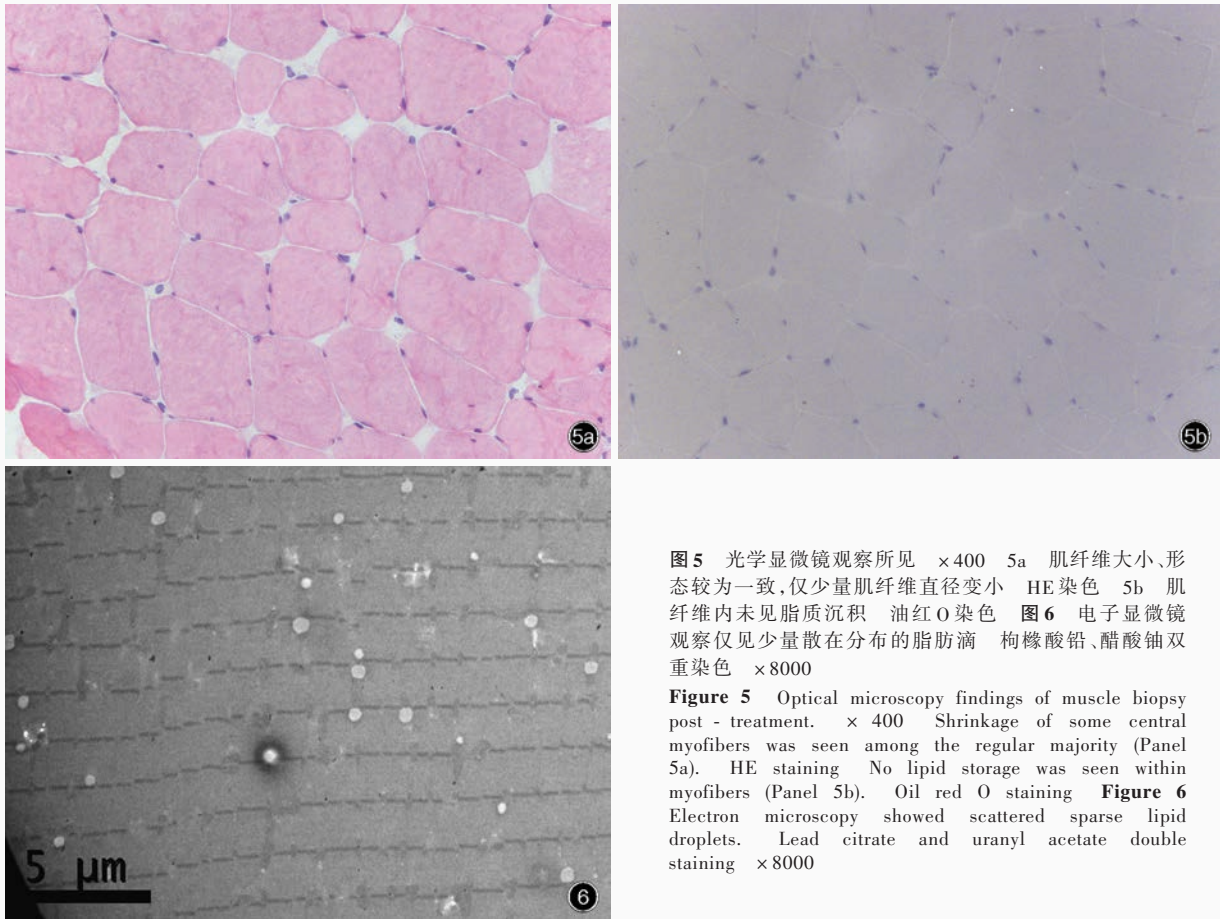


图5 光学显微镜观察所见 ×400 5a 肌纤维大小、形态较为一致,仅少量肌纤维直径变小 HE染色 5b 肌纤维内未见脂质沉积 油红O染色 图6 电子显微镜观察仅见少量散在分布的脂肪滴 枸橼酸铅、醋酸铀双重染色 ×8000

Figure 5 Optical microscopy findings of muscle biopsy post-treatment. ×400 Shrinkage of some central myofibers was seen among the regular majority (Panel 5a). HE staining No lipid storage was seen within myofibers (Panel 5b). Oil red O staining **Figure 6** Electron microscopy showed scattered sparse lipid droplets. Lead citrate and uranyl acetate double staining ×8000

为丙氨酸),查阅人类基因突变数据库(HGMD)和美国国立医学图书馆(PunMed)等数据库,未见相关报道。检索美国国家生物技术信息中心(NCBI)中 *ETFDH* 基因相关信息(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2110>),未发现 c.1694T 所在区域存在单核苷酸多态性(SNP)位点,表明 c.1694T>C 并非单核苷酸多态性位点。与此同时,对 c.1694T>C, p.Val565Ala 突变进行初步生物信息学分析(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; <http://www.mutationtaster.org/>),提示其极可能致病。综合上述分析,我们认为 c.1694T>C, p.Val565Ala 突变极可能致病。至此,该患者明确诊断为核黄素反应性脂质沉积性肌病。

讨 论

20世纪80年代初即有文献报道维生素B₂治疗脂质沉积性肌病有效。近年来,我国也开始采用维生素B₂治疗核黄素反应性脂质沉积性肌病,并取得了良好的效果^[6]。维生素B₂在体内以黄素腺嘌呤

二核苷酸(FAD)和黄素单核苷酸(FMN)两种形式参与氧化还原反应,是机体重要的线粒体内氧化还原酶辅基,如琥珀酸脱氢酶、黄嘌呤氧化酶和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)脱氢酶等,可改善线粒体功能,增强脂肪代谢,缓解临床症状。1999年, Vergani等^[7]报告2例脂质沉积性肌病患者,经维生素B₂治疗后肌肉和肌肉提取的线粒体中FAD和FMN缺乏部分或完全改善;2003年, Russell等^[8]采用维生素B₂治疗脂质沉积性肌病,发现机体内脂肪酸β氧化水平和呼吸链复合体I、II活性均明显升高且达正常水平。本文患者左卡尼汀单药治疗5年余,临床症状完全缓解,肌肉损害改善。推测其药理学机制可能与左旋肉碱将脂肪酸从胞质溶胶转运至线粒体有关,左旋肉碱具有防止脂肪酸在细胞内聚集的作用,从而改善脂质沉积性肌病患者临床症状与体征。2006年, Horvath等^[9]报告3例脂质沉积性肌病患者,经辅酶Q10补充治疗后,低辅酶Q10水平得到缓解;2007年, Gempel等^[10]对上述

3 例患者进一步行基因学检测,发现均呈 *ETFDH* 基因杂合突变,遂明确诊断为多种酰基辅酶 A 脱氢酶缺乏症,认为 *ETFDH* 基因突变可以导致继发性辅酶 Q10 缺乏,因此补充辅酶 Q10 即可缓解症状与体征。由此可见,由于维生素 B₂、左卡尼汀和辅酶 Q10 均参与线粒体脂肪酸氧化供能过程,因此单药或联合用药均可改善核黄素反应性脂质沉积性肌病患者临床症状与体征。由于该病系 *ETFDH* 基因突变所致,从药物经济学角度考虑维生素 B₂ 单药治疗仍是值得推荐的首选方案。虽然该例患者未行血清酰基肉碱谱检测,以及 *OCTN2* 和 *SLC22A5* 基因突变分析以排除原发性肉碱缺乏症,但据其临床仅有肌无力症状而无心脏和肾脏受累表现,基本可以排除。根据 *ETFDH* 基因突变分析结果,以及患者停用左卡尼汀 6 月余后仅单纯服用维生素 B₂ 仍维持良好效果,支持核黄素反应性脂质沉积性肌病的诊断。

与既往文献报道的脂质沉积性肌病病理改变相同^[11],该例患者肌肉组织活检亦表现为肌纤维内脂肪滴堆积,以 I 型纤维受累为主,电子显微镜观察可见线粒体和糖原数目增加;经左卡尼汀单药治疗 5 年后,肌肉异常病理改变明显改善,肌纤维大小、形态基本正常,无论是电子显微镜观察还是油红 O 染色均无脂肪滴增加表现。提示经相应药物治疗,在临床症状缓解的同时其肌肉病理改变亦可逆转,可能与肌肉组织脂肪酸代谢改善、脂肪利用增加有关。因此,在以肌肉组织活检作为脂质沉积性肌病诊断依据时,应采集尚未进行药物治疗的肌肉标本,包括糖皮质激素治疗前,避免由于治疗后肌细胞脂肪滴消失而导致的漏诊或误诊。

总之,核黄素反应性脂质沉积性肌病是少数可治性遗传代谢性肌病,正确诊断与治疗可使患者明显获益。诊断过程中需根据患者临床症状与体征、血清肌酶谱、血液生化指标、肌电图、肌肉病理及基因学检测等证据综合诊断;临床症状典型者无需行肌肉组织活检,直接行基因学检测以尽早明确诊断。所有影响脂质代谢的药物对核黄素反应性脂质沉积性肌病均有效,其机制值得进一步探讨,以为其他代谢性肌病的治疗提供有用线索。

参 考 文 献

[1] Dong WJ, Chen WJ, Wang N. Lipid storage myopathy.

Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2008, 8:109-111. [董碗娟, 陈万金, 王柠. 脂质沉积性肌病. 中国现代神经疾病杂志, 2008, 8:109-111.]

- [2] Xi JY, Lu JH, Zhao CB, Lin J, Luo SS, Zhu WH, Qiao K, Huang J, Wang Y. Clinical features and electron transfer flavoprotein dehydrogenase gene mutation analysis in 35 Chinese patients with lipid storage myopathy. Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi, 2011, 44:314-321. [奚剑英, 卢家红, 赵重波, 林洁, 罗苏珊, 朱雯华, 乔凯, 黄俊, 汪寅. 脂质沉积性肌病 35 例的临床特点及电子转移黄素蛋白脱氢酶基因突变分析. 中华神经科杂志, 2011, 44:314-321.]
- [3] Wang Y, Zhao DH, Hong DJ, Wang ZX, Yuan Y. Hot spot mutations in electron transfer flavoprotein dehydrogenase gene of riboflavin responsive lipid storage myopathy in 20 Chinese families. Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi, 2011, 44:309-313. [王韵, 赵丹华, 洪道俊, 王朝霞, 袁云. 核黄素反应性脂质沉积性肌病 20 个家系的电子转移黄素蛋白脱氢酶基因存在热点突变. 中华神经科杂志, 2011, 44:309-313.]
- [4] Wang ZQ, Chen XJ, Murong SX, Wang N, Wu ZY. Molecular analysis of 51 unrelated pedigrees with late-onset multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (MADD) in Southern China confirmed the most common ETFDH mutation and high carrier frequency of c.250G>A. J Mol Med (Berl), 2011, 86:569-576.
- [5] Er TK, Chen CC, Liu YY, Chang HC, Chien YH, Chang JG, Hwang JK, Jong YJ. Computational analysis of a novel mutation in ETFDH gene highlights its long-range effects on the FAD-binding motif. BMC Struct Biol, 2011, 11:43.
- [6] Wen B, Dai T, Li W, Zhao Y, Liu S, Zhang C, Li H, Wu J, Li D, Yan C. Riboflavin-responsive lipid-storage myopathy caused by ETFDH gene mutations. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010, 81:231-236.
- [7] Vergani L, Barile M, Angelini C, Burlina AB, Nijtmans L, Freda MP, Brizio C, Zerbetto E, Dabbeni-Sala F. Riboflavin therapy: biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies. Brain, 1999, 122(Pt 12):2401-2411.
- [8] Russell AP, Schrauwen P, Somm E, Gastaldi G, Hesselink MK, Schaart G, Kornips E, Lo SK, Bufano D, Giacobino JP, Muzzin P, Ceceon M, Angelini C, Vergani L. Decreased fatty acid beta-oxidation in riboflavin-responsive, multiple acylcoenzyme A dehydrogenase-deficient patients is associated with an increase in uncoupling protein-3. J Clin Endocr Metab, 2003, 88:5921-5926.
- [9] Horvath R, Schneiderat P, Schoser BG, Gempel K, Neren-Jacob E, Plöger H, Müller-Höcker J, Pongratz DE, Naini A, DiMauro S, Lochmüller H. Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy. Neurology, 2006, 66:253-255.
- [10] Gempel K, Topaloglu H, Talim B, Schneiderat P, Schoser BG, Hans VH, Palmafay B, Kale G, Tokatli A, Quinzii C, Hirano M, Naini A, DiMauro S, Prokisch H, Lochnuller H, Horvath R. The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. Brain, 2007, 130(Pt 8):2037-2044.
- [11] Chen L, Guo Z, Guo YP, Liu XY, Ren HT, Gao SF. Clinical and pathological features of lipid storage myopathy. Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi, 1998, 31:165-167. [陈琳, 郭重, 郭玉璞, 刘兴渊, 任海涛, 高淑芳. 脂质沉积性肌病的临床和病理特点. 中华神经科杂志, 1998, 31:165-167.]

(收稿日期:2014-04-29)