

针吸型肌肉活检联合免疫荧光在假肥大型肌营养不良诊断中的应用

宋楠 王红梅

【摘要】 目的 探讨应用针吸型肌肉活检结合免疫荧光染色诊断假肥大型肌营养不良症的应用价值及意义。**方法** 应用针吸型活检术取 533 例假肥大型肌营养不良症患者(415 例 DMD, 118 例 BMD)的肌组织,采用 HE 染色观察肌细胞形态,免疫荧光染色技术检测抗肌营养不良蛋白,以 2 例正常人的肌细胞作为对照。**结果** 正常人肌细胞膜上抗肌萎缩蛋白染色阳性,可见沿肌细胞膜分布完整的荧光条带;DMD 患者肌膜染色阴性,肌细胞膜完全不显色;BM D 患者染色弱阳性,可见沿肌细胞膜分布的间断斑片状荧光带。**结论** 应用针吸型活检术联合免疫荧光染色可以有效的检测抗肌营养不良蛋白的表达,有助于 DMD 和 BMD 的确诊及鉴别诊断。

【关键词】 抗肌萎缩蛋白 免疫荧光 针吸型肌肉活检

【中图分类号】 R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)03-0177-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.03.009

The application of needle muscle biopsy combined with immunofluorescence in diagnosing of pseudohypertrophic muscular dystrophy Song Nan, Wang Hongmei. The 463 Hospital of People's Liberation Army, Shenyang 110042

【Abstract】 Objective To explore the application significance and value of needle muscle biopsy combined with immunofluorescence in diagnosing of pseudohypertrophic muscular dystrophy. **Methods** The muscle specimens were obtained from 533 patients(415 DMD and 118 BMD) with pseudohypertrophic muscular dystrophy by using needle biopsy. The sections were treated with HE stain, and the pathological changes were observed. Dystrophin in muscle cells was detected by immunofluorescence technique and compared with two normal muscle. **Results** The normal muscle showed ringed positive staining stripes around muscle cells. Negative result of staining was seen in DMD patients. The discontinuous positive staining was showed in BMD patients. **Conclusion** Detecting dystrophin in muscles cells by needle biopsy and immunofluorescence technique is an efficient method for diagnosing and distinguishing DMD and BMD.

【Key words】 Dystrophin protein Immunofluorescence Needle muscle biopsy

假性肥大型肌营养不良症(Hypertrophical muscular dystrophia)是一组 X-连锁隐性遗传的神经肌肉疾病。包括 Duchenne 型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)和 Becker 型肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD),其中 DMD 最严重,其发病率约为 1/3 500 活男婴^[1],3~6 岁发病,主要临床表现为进行性的肌肉萎缩和腓肠肌等部位的假性肥大,可累及呼吸肌和心肌,最终可因呼吸循环功能衰竭而死亡^[1],而 BMD 患者病情较轻而且多样化,在年轻时仅出现肌肉无力,心脏

受累出现在肌肉萎缩前,多在 60 岁前死于心脏病^[2]。本研究针对 2009 年 5 月开始治疗的 415 例 DMD 患者及 118 例 BMD 患者,首次应用针吸型活检术结合免疫荧光染色的方法检测患者肌肉的形态学变化和 dystrophin 蛋白的表达,为神经肌肉系统疾病的诊断开辟了一条新途径。

1 材料与方法

1.1 病例来源 收集在中国人民解放军第四六三医院细胞治疗中心住院的 415 例 DMD 和 118 例 BMD 患者资料,均经临床症状、肌电图、血清酶谱和核磁共振等确诊。对照组为正常人肌肉组织。所有标本使用均经患者知情并同意。

1.2 针吸型肌肉活检 患者取仰卧位,充分暴露其双下肢,常规皮肤消毒。术者右手持 TZ 半自动活检枪,于股四头肌部位尽量避开血管与神经进针,按下开关后拔出,将针芯内的肌肉组织取出备用。

1.3 冰冻切片制备 应用针吸型活检术吸取患者股四头肌,经 OCT 包埋剂包埋,液氮骤冷,置入恒冷式冰冻切片机切片,厚度均为 8 μm 。

1.4 HE 染色 切片经甲醇固定,苏木素染色 5 min,盐酸酒精分化后反蓝 15 min,伊红染色 3 min,经梯度酒精、二甲苯后中性树胶封片,光镜下观察。

1.5 免疫荧光化学染色 切片经甲醇固定,3% H_2O_2 溶液抑制内源性过氧化物酶,PBS 洗涤 3 min \times 3 次;用 5 % 的正常羊血清于室温下封闭非特异性抗原 20 min;一抗用 dystrophin 抗体(1:100 稀释),放入湿盒内 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜;第 2 天用 PBS 洗涤 3 min \times 3 次,滴加荧光二抗兔抗小鼠 IgG-FITC(1:100 稀释),室温孵育 20 min。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,以正常人的肌组织切片作为阳性对照。显色,脱水,封片观察。

1.6 dystrophin 判定 dystrophin 阳性部位位于细胞膜,呈绿色为阳性,不着色为阴性。

2 结 果

2.1 HE 染色

正常肌肉 HE 染色显示肌纤维大小均匀,呈网格状排列,肌膜核位于肌纤维的周边(图 1)。DMD 患者肌纤维显示大小不等,外形变圆,萎缩和肥大的肌纤维并存,大量的细胞核内移,其间纤维组织明显增生,脂肪组织浸润(图 2)。BMD 患者肌纤维存在大小不等,细胞核内移,但纤维组织增生和脂肪浸润明显减少(图 3)。

2.2 免疫荧光染色

正常肌肉荧光显示肌细胞膜上出现强度均匀一致的绿色完整荧光条带,为 dystrophin 阳性表达(图 4)。DMD 患者肌细胞膜均无着色,为 dystrophin 阴性(图 5)。BMD 患者肌细胞膜上绿色荧光条带间断出现,强度不一致,部分存在,呈斑片状分布(图 6)。

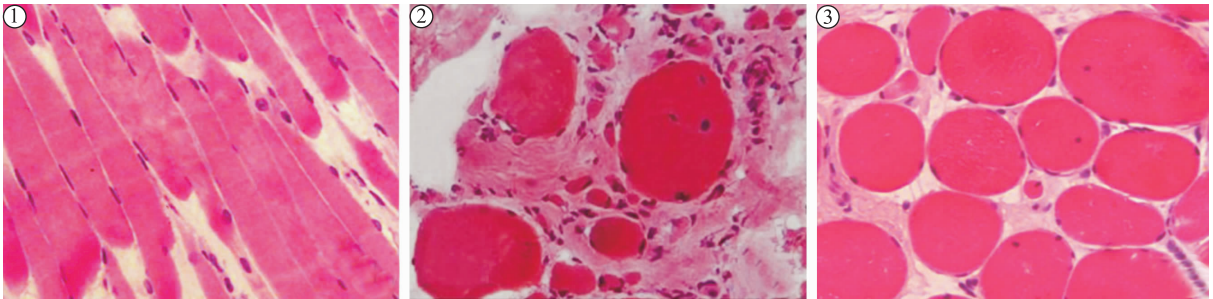


图 1 正常人肌肉组织(HE 染色 $\times 400$ 镜),肌纤维大小均匀,呈网格状排列 图 2 DMD 患者肌肉(HE 染色 $\times 400$ 镜),肌纤维明显萎缩,少部分肥大,其外形变圆,细胞核内移,其间大量的纤维增生 图 3 BMD 患者肌肉组织(HE 染色 $\times 400$ 镜),肌纤维萎缩与肥大并存,细胞核内移,其间存在纤维增生

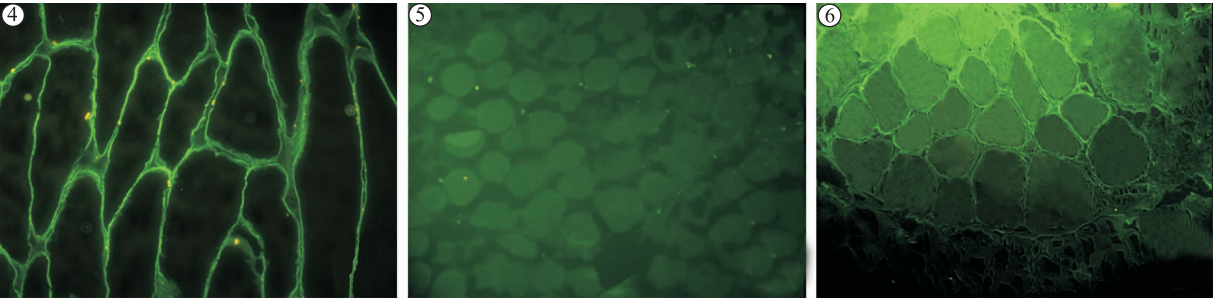


图 4 正常人肌肉组织冰冻切片(dystrophin 免疫荧光染色 $\times 400$ 倍),dystrophin 蛋白阳性,肌细胞膜上可见完整的环形条带 图 5 DMD 患者肌肉组织冰冻切片(dystrophin 免疫荧光染色 $\times 400$ 倍),dystrophin 蛋白阴性 图 6 BMD 患者肌肉组织冰冻切片(dystrophin 免疫荧光染色 $\times 400$ 倍),dystrophin 蛋白阳性,强度不均一,间断表达

3 讨论

假肥大型肌营养不良是一种进行性加重的 X 连锁隐性遗传肌肉变性疾病,累及多系统疾病。DMD 患儿一般 3~5 岁发病,病情渐加重,患者多在 12 岁左右不能行走,后期因心肌细胞纤维化,造成扩张型心肌病^[4],可引起心脏节律的改变及心衰,后累及呼吸肌,造成呼吸障碍,后导致呼吸衰竭。抗肌萎缩蛋白基因即 dystrophin 位于 Xp21.2 上,是 DMD 的致病基因,由 79 个外显子和 78 个内含子构成,其编码产物为 dystrophin 蛋白。该蛋白主要分布于神经组织和肌肉组织中,其主要作用是保护肌细胞膜的完整性和维持肌细胞的正常收缩^[5],一旦 dystrophin 蛋白缺失,将会造成肌细胞膜的破坏,导致肌纤维的坏死和肌肉组织的纤维化,出现替代的脂肪组织和结缔组织,进而出现肌肉萎缩和假性肥大的临床症状^[6]。

假性肥大型肌营养不良是一种基因改变的遗传病,但基因诊断存在一定漏诊率,且 Duchenne 型肌营养不良与 Becker 型肌营养不良的区分仅能依靠肌肉活检,但开放式肌肉活检因操作复杂,存在风险率高,难以接受。针吸型肌肉活检操作简单、快速,对人体损伤小,比较易于接受。虽然应用免疫组化方法诊断该病在国内都有应用,但本研究首次应用了针吸型活检术和免疫荧光染色联合诊断该病,在国内外均为首次报道。

本研究结果显示正常人的肌肉组织肌细胞形态正常,dystrophin 蛋白正常表达,位于肌细胞膜周边。DMD 患者肌细胞 dystrophin 基因缺失,缺失后的分子重排产生移码突变^[7],导致整个阅读框发生根本变化,产生新的终止密码,使抗肌萎缩蛋白的翻译过程提前结束,从而产生一个高度短缩、没有核心功能区的异常蛋白质,这种异常蛋白质不具有形成完整细胞骨架的功能,造成细胞形态发生变化,出现肌细胞的萎缩肌代偿性肥大。BMD 患者肌细胞基因改变未影响其阅读框,产生的蛋白质仅是长度

变化,而主要功能区域未改变,故其 dystrophin 蛋白表达强度不均,位于细胞膜周边,肌细胞形态发生一定程度的改变,但其病情较 DMD 轻^[8]。因此,检测 dystrophin 蛋白的表达情况有助于疾病的诊断和鉴别。

综上所述,鉴于假肥大型肌营养不良的基本病理基础是 dystrophin 的缺失,目前诊断假性肥大型肌营养不良主要依靠基因诊断,主要是 MLPA(多重连接探针扩增技术)和荧光原位杂交等方法,但是其变异程度比较大,对于 DMD 和 BMD 的鉴别是基因诊断所无法做到的,可应用免疫荧光等方法检测 dystrophin 蛋白进行鉴别,本研究应用针吸型活检术,取材便利,联合形态学和免疫荧光的方法。

参考文献

- [1] Mukherjee M, Mittal B. Muscular dystrophies[J]. The Indian Journal of Pediatrics, 2004, 71(2): 161-168.
- [2] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy[J]. Lancet Neurol, 2010, 9(2): 177-189.
- [3] Nardes F, Araujo AP, Ribeiro MG. Mental retardation in Duchenne muscular dystrophy[J]. J Pediatr (Rio J), 2012, 88(1): 6-16.
- [4] Verhaert D, Richards K, Rafael-Fortney JA. Cardiac involvement in patients with muscular dystrophies magnetic resonance imaging phenotype and genotypic considerations[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2011, 4(1): 67-76.
- [5] Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(10): 762-773.
- [6] Pastoret C, Sebillé A. MDX MICE SHOW PROGRESSIVE WEAKNESS AND MUSCLE DETERIORATION WITH AGE[J]. J Neurol Sci, 1995, 129(2): 97-105.
- [7] Blake DJ, Weir A, Newey SE, et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle[J]. Physiol Rev, 2002, 82(2): 291-329.
- [8] Takeshima Y, Yagi M, Okizuka Y, et al. Mutation spectrum of the dystrophin gene in 442 Duchenne/Becker muscular dystrophy cases from one Japanese referral center[J]. J Hum Genet, 2010, 55(6): 379-388.

(2015-09-11 收稿)