

·论著·

腓骨肌萎缩症 X1 型汉族患者电生理和病理特征分析

李琳¹, 张如旭²

作者单位
1. 武汉市第三医院
(武汉大学附属同仁医院)神经内科
武汉 443000
2. 中南大学湘雅三
医院神经内科
长沙 410008
收稿日期
2018-05-17
通讯作者
张如旭
zhanruxu@vip.163.
com

摘要 目的:探讨因 *GJB1* 基因突变导致的腓骨肌萎缩症 X1 型(CMTX1)中国汉族患者的神经电生理特点和病理特征,并进一步分析病理类型与神经电生理间关系。**方法**:对 12 个家系经过测序证实为 *GJB1* 点突变的 35 例 CMTX1 患者的电生理结果进行回顾性分析,对其中来自 4 个不同家系 4 例患者进行腓肠神经活检,行超微电镜观察。**结果**:*GJB1* 基因突变 CMTX1 患者 35 例,存在运动神经传导速度(MNCV)的轻、中度减慢,CMAP 波幅的减低较 MNCV 减慢更明显。4 例患者腓肠神经病理改变均存在有髓神经纤维数量减少,丛性结构,轴索外髓鞘内间隙,未见典型洋葱头样结构。即为轴索病变同时伴有脱髓鞘病变,且以轴索病变为主。**结论**:*GJB1* 基因突变的 CMTX1 表现为中间型,且以轴索病变为主,神经电生理及病理结果表现具有一致性。**关键词** 腓骨肌萎缩症 X1 型; *GJB1* 基因;神经电生理;神经病理
中图分类号 R741;R746.4 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.03.006
李琳, 张如旭. 腓骨肌萎缩症 X1 型汉族患者电生理和病理特征分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14 (3): 128-131.

Comparative Study of Electrophysiology and Pathology of Chinese Han Patients with CMTX1
LI Lin¹, ZHANG Ru-xu². 1. Department of Neurology, Wuhan Third Hospital (Tongren Hospital of Wuhan University), Wuhan 443000, China; 2. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract Objective: To investigate the electrophysiological characteristics and pathological changes of Chinese Han CMTX1 Patients with *GJB1* point mutations, and to analyze the relationship between pathological type and neurophysiology. **Methods:** Thirty-five patients from 12 families were sequenced CMTX1 patients with *GJB1* point mutations which analyzed for electrophysiological evaluation. Four patients from four different families were subjected to sural nerve biopsy and analyzed by electron microscopy. **Results:** There were 35 cases of CMTX1 patients with *GJB1* point mutations, and the amplitude of CMAP was decreased, which was significantly lower than that of MNCV. Electron microscopic examination of neurological biopsy in 4 cases showed that numbers of myelinated nerve fibers decreased, more cluster formations, axonal neuropathy. **Conclusion:** Electrophysiological finding support primary axonal neuropathy. in CMTX1 with *GJB1* mutations. Pathological findings are axonal neuropathy accompanied by demyelinating lesions, mainly for axonal neuropathy. Electrophysiological and pathological analysis results are consistent.

Key words CMTX1; *GJB1* gene; electrophysiology; pathology

腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT)是一组具有高度临床及遗传异质性的最常见的周围神经单基因遗传病,患病率约为(17~40)/10 000^[1]。伴 X 染色体显性遗传的 CMTX1 型,占 CMT15%左右^[2],CMTX1 是由位于 X 染色体的缝隙连接蛋白基因(gapjunction protein beta 1, *GJB1*)突变导致。目前 *GJB1* 基因突变 CMTX1 患者电生理和病理改变争议较大,尤其是病理类型的意见不统一,本研究对排除 *PMP22* 大片段重复突变和无男传男的 CMT 家系中 *GJB1* 基因突变的 CMTX1 患者,进行电生理检查及病理检查,并对其进行比较分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

12 个 CMT 家系于 2004~2016 年由湘雅医院、湘雅三医院神经内科门诊和医学遗传学国家重点实验室遗传门诊收集,分别来自湖南、湖北、广东、河南、河北、浙江等,所有患者均为汉族,均符合 1980 年 Harding 等^[3]制定的 CMT 诊断标准,经伦理委员会批准,所有家系均签署知情同意后通过排除 *PMP22* 大片段重复突变和无男传男的 CMT 家系,进行 *GJB1* 基因突变分析。12 个 *GJB1* 基因突变 CMTX1 家系中 35 例患者均采用丹麦 keypoint 神经肌电图仪行神经电生理检查,4 例患者进行腓肠神经活检超薄切片电镜下观察。

1.2 方法

1.2.1 基因突变分析 在获得被采集者的知情同意后,采取肘静脉血进行基因组DNA的提取和定量,进行*GJB1*基因突变检测,采用基因突变分析,PCR扩增后送测序,Cx32的PCR引物由上海生工公司合成,引物序列参见文献^[4]。测序PCR产物进行核酸外切酶酶切纯化后通过测序仪进行DNA序列分析,使用DNASTAR软件分析测序结果。

1.2.2 神经电生理 所有35例经分析证明为*GJB1*基因突变的CMTX1患者采用神经肌电图仪(Keypoint型,丹麦)进行神经电生理检查,收集患者右侧上下肢运动神经资料。采用同心圆针电极记录,右侧正中神经、尺神经、胫神经运动神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MNCV),复合肌肉运动电位波幅(compound motoractive potentials, CMAP)。CMAP以腕部和踝部的数值为研究对象。未选用腓总神经,因其常为受累最重神经,无法引出CMAP和MNCV的频率高,可能导致偏差。

1.2.3 神经活检及电镜观察 针对4个CMTX不同家系4例先证者行腓肠神经活检,在外踝后上方2 cm处常规皮肤消毒,局麻,切开皮肤,在皮下组织内寻找腓肠神经,找到后分离出约1/4~1/2,近端以利多卡因封闭,切取2 cm左右,缝合。神经标本取材后进行处理:①固定:2.5%戊二醛固定24 h以上;②后固定:1%锇酸固定2 h;③梯度脱水:依次50%、70%、90%、100%丙酮脱水,每级10 min×3次;④浸泡:环氧树脂混合液:纯丙酮=1:1,37℃,浸泡24 h;⑤包埋:Epon812(Epoxiaquivalentgewicht145-160)、DDSA(Dodecenylsuccinic Anhydride)、MNA(Methyl Nadic Anhydride)、DMP30(dimethylaminomethyt phenol)、60℃,24 h包埋成块;⑥修块、定位:半薄切片,甲苯氨蓝染色观察,选取所需要的部位;⑦超薄切片:瑞典产LKB-Ⅲ型超薄切片机切片,厚约0.00055 μm;⑧电子染色:醋酸铀、硝酸铅双重染色;⑨日产H-7500型投射电镜观察、照片。通过电镜观察超微结构定性分析髓鞘和轴索改变特点。

1.3 统计学处理
采用SPSS19.0软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,*t*检验,计数资料以率表示, χ^2 检验,若单元格期望计数不满足 χ^2 检验则采用Fisher确切概率计算方法,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

本研究收集12个家系中检测到*GJB1*基因突变的CMTX1患者35例,男22例,女13例;发病年龄10~40岁;病程1~30年。

2.1 CMTX1患者电生理特点

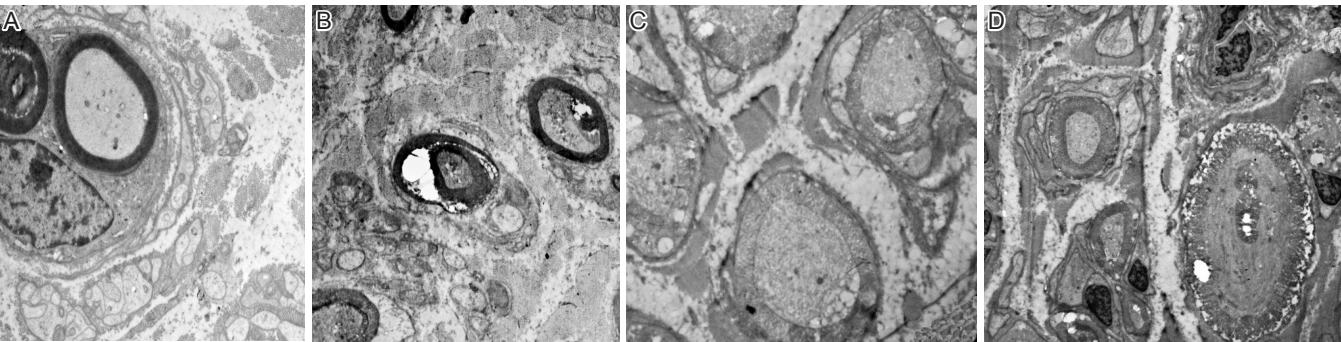
本组CMTX1患者正中神经MNCV为21~52 m/s,尺神经MNCV29.3~60 m/s,胫神经MNCV15~53 m/s;男性患者的正中神经和尺神经MNCV及CMAP明显低于女性患者(*P*<0.01或*P*<0.05),胫神经MNCV低于女性(*P*<0.05),但CMAP与女性差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1;患者胫神经CMAP≤0.1 mV的百分率均明显高于正中神经和尺神经,考虑下肢神经受累度高于上肢,有显著性差异(*P*<0.01),且男性与女性差异无统计学意义(*P*>0.05),见表1。

2.2 CMTX1患者病理特点

本研究经*GJB1*基因突变检测确诊的来自CMTX1不同家系的4例先证者,对其行腓肠神经活检并行电镜观察,其中有髓神经纤维数量减少2例,丛性结构2例,轴索外髓鞘内间隙3例,轴索萎缩3例。腓肠神经活检电镜下可见有髓神经纤维分布稀疏,有髓神经纤维数量减少,可见丛性结构(图1A)。有髓神经纤维髓鞘厚薄不一,可见薄髓鞘的有髓神经纤维,有髓神经纤维髓鞘存在疏松、分层样改变,轴索内线粒体水肿、空泡化,可见轴索外髓鞘内间隙扩大(图1B、图1C)。部分有髓神经纤维存在轴索萎缩或消失(图1D)。均未见典型有髓神经纤维洋葱头样结构。腓肠神经活检电镜下表现为轴索病变同时伴有脱髓鞘病变,以轴索病变为主。

表1 男性和女性CMTX1患者神经电生理指标比较

性别	例数	根数	正中神经			根数	尺神经			根数	胫神经		
			MNCV/ (m/S, $\bar{x}\pm s$)	CMAP/ (mV, $\bar{x}\pm s$)	CMAP ≤0.1 mV/ 例		MNCV/ (m/S, $\bar{x}\pm s$)	CMAP/ (mV, $\bar{x}\pm s$)	CMAP ≤0.1 mV/ 例		MNCV/ (m/S, $\bar{x}\pm s$)	CMAP/ (mV, $\bar{x}\pm s$)	CMAP ≤0.1 mV/ 例
男性	22	22	35.5±6.1	2.6±1.8	1	22	34.2±4.2	3.4±2.1	1	22	26.7±9.5	2.2±1.7	11
女性	13	13	41.5±7.3	4.3±2.8	0	15	44.3±7.1	4.9±2.1	0	15	34.4±8.1	2.4±1.8	3
<i>t</i> 值			-2.614	-2.193	/		-5.440	-2.133	/		-2.565	-0.343	3.413
<i>P</i> 值			<0.001	<0.05	1.0		<0.001	<0.05	1.0		<0.05	>0.05	0.065



注:A:典型丛性结构:一个雪旺氏细胞包裹2根有髓纤维,其中1个有髓神经纤维的髓鞘分层(×5 000);B:髓鞘分层、水肿、疏松化,轴索外髓鞘内间隙扩大(×5 000);C:有髓神经纤维髓鞘疏松,分层,空泡变,轴索内线粒体水肿、空泡化(×15 000);D:髓鞘疏松,灶性溶解、空泡化,轴索萎缩或消失(×5 000)

图1 CMTX1患者腓肠神经电镜下病理

3 讨论

CMT是一组最常见的在病理和遗传学方面都有高度异质性的周围神经遗传病。CMTX1是一种性连锁遗传亚型,是由位于染色体Xq13.1的*GJB1*基因突变所致。Cx32在周围神经的表达模式与其他髓鞘蛋白基因相似,然而免疫组化研究却显示其存在不同的位置,存在于施万细胞的Schmidt-Lanterman切迹以及郎飞结,其基因突变后出现表达减少,导致轴索-施万细胞的功能障碍^[5]。对于*GJB1*基因突变的CMTX1,其病理表现各有不同的观点,且针对亚洲人种研究极少,本研究结合CMTX1患者的电生理结果及其病理结果进行比较分析。

本组CMTX1患者的MNCV存在轻中度下降,也同时有CMAP波幅减低,且男性患者MNCV要比女性慢,且CMAP波幅下降更显著,患者胫神经CMAP≤0.1 mV的百分率均明显高于正中神经和尺神经,提示胫神经比正中神经及尺神经受累更加明显,下肢比上肢CMAP波幅减低更明显提示下肢受累程度高于上肢,提示有明显的髓鞘和轴索共同损害的证据。其无论是男性患者还是女性患者MNCV减低的程度不是那么明显,推测脱髓鞘改变至少不是CMTX1的主要特征,其CMAP反映轴索改变,而CMTX1患者CMAP减低较为明显,提示有髓神经纤维的轴索损害更明显,传导速度的下降提示伴随髓鞘的损害,下肢更显著。CMTX1具有中间型周围神经病的特点。既往研究提示其电生理改变特点是神经传导速度的中等程度减慢^[6],研究显示CMTX1兼有MNCV减低,也同时有CMAP波幅的减低,且表现出下肢明显比上肢差的特点^[7]。本研究结果也与既往研究相符。电生理指标提示CMTX1为轴索和髓鞘共同损害,以轴索损害为主。

目前对于Cx32病变所致的CMTX1,其病理表现各有不同的观点,Cx32是一种髓鞘蛋白,有研究认为

CMTX1是以脱髓鞘改变为主的遗传性周围神经病^[8,9]。Fischbeck等^[10]于1986在CMTX患者神经活检中发现特征性的洋葱头样结构。而更多的研究认为CMTX1是以轴索损害为主的周围神经病。Madrid等研究^[11]发现CMTX1患者神经活检存在明显的轴索再生改变及丛性结构。Hahn等^[12]研究发现有髓神经纤维出现Schmidt-Lanterman切迹加宽、轴索外髓鞘内间隙扩大,也有轴索的再生改变,认为CMTX1是以明显轴索变性为主,伴随脱髓鞘改变。Hattori等^[13]研究也提示*GJB1*基因突变神经活检病理是以轴索损害为主的病变及同时伴少量的脱髓鞘改变。有髓神经纤维密度中度减少,且以大直径的有髓神经纤维损失为主,其小直径有髓神经纤维可能为神经纤维再生的后果,无髓纤维密度在正常范围。丛性结构较常见,提示其轴索损害较明显。本组来自CMTX1不同家系的4例先证者,其肌电图均提示运动神经传导速度存在轻中度下降,也同时有CMAP波幅的减低,其病理改变可见轴索外髓鞘内间隙扩大、丛性结构、轴索萎缩,提示轴索损害并伴有增生现象,可见有髓神经纤维数量减少,薄髓鞘有髓神经纤维,及不同程度的脱髓鞘病变。此次电镜下可观察到不同程度的有髓神经纤维的髓鞘疏松、灶性溶解、虫蚀状改变,其病变的髓鞘即见于有轴索损害的有髓神经纤维,同时也见于轴索结构还保持相对完好的有髓神经纤维,提示可能髓鞘损害发生于轴索损害,因此,还不能确定是轴索继发于髓鞘的改变还是髓鞘继发于轴索的改变。本组均有不同程度脱髓鞘病变,但未见典型的洋葱头结构。电镜下还见到轴索外髓鞘下间隙扩大,部分轴索内容物溶解、消失,丛样增生结构,表明存在轴索变性及其增生。本组研究4例CMTX1先证者的神经病理是脱髓鞘病变和轴索病变并存,以轴索病变改变为重。其电生理表现得到病理证据的支持。

本研究提示 *GJB1* 基因突变的 CMTX1 表现为中间型,且以轴索病变为主,神经电生理及病理结果表现具有一致性。利用电生理及组织病理学检查对腓骨肌萎缩症分型有一定价值,可为筛查基因诊断提供依据。

参考文献

[1] Patzko A, Shy ME. Update on Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2011,11: 78-88.
 [2] Huttner IG, Kennerson ML, Reddel SW, et al. Proof of genetic heterogeneity in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Neurology, 2006, 67: 2016-2021.
 [3] Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II[J]. Brain, 1980,103: 259-280.
 [4] 张如旭, 郭鹏, 任志军, 等. LITAF, RAB7, LMNA 和 MTMR2 基因在中国人腓骨肌萎缩症患者的突变分析[J]. 遗传, 2010, 32: 817-823.
 [5] Capasso M, Di MA, Ferrarini M, et al. Inter-nerves and intra-nerve conduction heterogeneity in CMTX with Arg(15)Gln mutation[J]. Clin Neurophysiol, 2004, 115: 64-70.
 [6] Pareyson D, Scaiola V, Laurà M. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Neuromolecular Med, 2006, 8: 3-22.

[7] Senderek J, Hermanns B, Bergmann C, et al. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy: clinical, electrophysiological, and morphological phenotype in four families with different connexin32 mutations(1)[J]. J Neurol Sci, 1999, 167: 90-101.
 [8] Gutierrez A, England JD, Sumner AJ, et al. Unusual electrophysiological findings in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease[J]. Muscle Nerve, 2000, 23: 182-188.
 [9] Stephanova DI, Daskalova M, Alexandrov AS. Differences in potentials and excitability properties in simulated cases of demyelinating neuropathies. Part I[J]. Clin Neurophysiol, 2005, 116: 1159-1161.
 [10] Fischbeck KH, ar-Rushdi N, Pericak-Vance M, et al. X-linked neuropathy: gene localization with DNA probes[J]. Ann Neurol, 1986, 20: 527-532.
 [11] Madrid R, Bradley WG, Davis CJF. The peroneal muscular atrophy syndrome: Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies part 2. Observations on pathological changes in sural nerve biopsies[J]. J Neurol Sci, 1977, 32: 91-122.
 [12] Hahn AF, Ainsworth PJ, Bolton CF, et al. Pathological findings in the x-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphometric and ultrastructural analysis[J]. Acta Neuropathol, 2001, 101: 129-139.
 [13] Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients[J]. Brain, 2003, 126: 134-151.

(本文编辑:王晶)

(上接第115页)

脑梗死相关性的研究报告。

本研究以此为研究依据,针对海南地区患有动脉硬化性脑梗死的患者肝脏表达的 PCK1 启动子-232 基因进行筛查,对比正常成年体检者表达的结果,探讨两者之间的相关性。本研究结果显示,脑梗死患者 PCK1 启动子-232 基因表达的 GC、GG 基因型频率及 G 等位基因频率明显高于正常成年人,说明 PCK1 启动子-232 基因的 G 等位基因与脑梗死的发生有关;而脑梗死患者中 GC 型和 GG 型餐后 2 h 血糖、LDL-C 明显高于 CC 型,说明肝脏表达 PCK1 的通过 G 等位基因来调控血糖、血脂水平,从而影响脑梗死的发生^[14]。本研究同时发现,脑梗死患者和正常成年人的双侧颈总动脉内膜中层厚度之间无明显差异,但在脑梗死患者中,存在易损斑块的患者中 GC、GG 基因型频率及 G 等位基因频率明显高于非易损的患者,说明肝脏表达的 PCK1 的 G 等位基因可能是导致易损斑块形成的因素之一^[15]。

综上所述,对海南地区人群的 PCK1 启动子-232 基因的多态性进行筛查可有效预测当地动脉硬化性脑梗死的发生。但本研究仅仅是通过单基因研究得出的结论,且种族差异和研究对象数量受限等可能影响结果准确性,尚需对研究工作进一步的优化。

参考文献

[1] Okoreeh AK, Bake S, Sohrabji F. Astrocyte-specific insulin-like growth factor-1 gene transfer in aging female rats improves stroke outcomes[J]. Glia, 2017, 65: 1043-1058.
 [2] Kumar P, Misra S, Kumar A, et al. Association between Tumor

Necrosis Factor- α (-238G/A and -308G/A) Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-Analysis[J]. Pulse (Basel), 2016, 3: 217-228.
 [3] 焦立影, 王新, 刘婷婷, 等. 纤维肌发育不良致自发性颈动脉夹层并脑梗死一例诊治分析[J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25: 102-105.
 [4] Kumar P, Yadav AK, Kumar A, et al. Association between Interleukin-6 (G174C and G572C) promoter gene polymorphisms and risk of ischaemic stroke: A meta-analysis[J]. Ann Neurosci, 2015, 22: 61-9.
 [5] Huck JH, Freyer D, Böttcher C, et al. De novo expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35: 1804-1811.
 [6] 冯兆章, 张远鸿, 腾录霞, 等. CT 血管造影检查联合 ABCD2 评分对短暂性脑缺血发作后早期脑梗死的预测价值研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2015, 23: 110-112.
 [7] Shahaduzzaman MD, Mehta V, Golden JE, et al. Human umbilical cord blood cells induce neuroprotective change in gene expression profile in neurons after ischemia through activation of Akt pathway[J]. Cell Transplant, 2015, 24: 721-735.
 [8] 李鹏燕, 朱雨岚. 进展性腔隙性脑梗死的发病机制研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 429-431.
 [9] 李友, 廖锋, 崔理立, 等. 去整合素金属蛋白酶 10 基因启动子区多态性变化与腔隙性脑梗死发病风险的关系[J]. 山东医药, 2014, 54: 4-7.
 [10] Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, et al. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice[J]. Neuroscience, 2013, 252: 302-319.
 [11] 王婉芬, 王凤, 朱敏, 等. 基质金属蛋白酶 8-799C/T 基因多态性与颈动脉斑块易损性的关联分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29: 60-63.
 [12] Raida Z, Hundahl CA, Nyengaard JR, et al. Neuroglobin over expressing mice: expression pattern and effect on brain ischemic infarct size[J]. PLoS One, 2013, 8: e76565.
 [13] Pandi G, Nakka VP, Dharap A, et al. MicroRNA miR-29c down-regulation leading to de-repression of its target DNA methyltransferase 3a promotes ischemic brain damage[J]. PLoS One, 2013, 8: e58039.
 [14] 李凤, 陈明, 喻明, 等. MMP-2 基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死初发及复发相关性研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32: 104-107.
 [15] Pulliam JV, Xu Z, Ford GD, et al. Computational identification of conserved transcription factor binding sites upstream of genes induced in rat brain by transient focal ischemic stroke[J]. Brain Res, 2013, 1495: 76-85.

(本文编辑:王晶)