

·论著·

5例晚发型糖原贮积症Ⅱ型患者的临床分析

杜华^{1,3}, 钟延丰², 郑丹枫², 师永红^{1,3}, 徐晓艳^{1,3}, 翁立新^{1,3}, 马秀梅^{1,3}, 于慧玲^{1,3}, 师迎旭³

作者单位

1. 内蒙古医科大学基础医学院病理学系

呼和浩特 010110

2. 北京大学医学部基础医学院病理学系

北京 100191

3. 内蒙古医科大学附属医院检验科

呼和浩特 010030

基金项目

内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划资助(No.NJYT-18-B18);

内蒙古自治区自然科学基金(No.2019LH08032);

内蒙古医科大学科技百万工程(No.YKD2017KJBW004);

内蒙古医科大学附属医院一般科研项目(No.NYFY YB040)

收稿日期

2019-12-18

通讯作者

师迎旭

shiyingxu@126.

com

摘要 目的:探讨糖原贮积症的临床病理特征。**方法:**对5例晚发型糖原贮积症患者的临床、病理资料进行回顾性分析,并进行病理形态学、特殊染色及电镜观察。**结果:**本组5例患者体格检查显示四肢远端、躯体肌肉均匀萎缩;四肢肌张力不同程度降低,颈肌力量稍差,Gewer征阳性。实验室检查血清肌酸激酶(CK)均有不同程度升高。肌电图显示多呈肌源性损害表现,其中3例伴强直样放电及飞机俯冲声。光镜下肌纤维束膜基本完整,染色不均,肌原纤维结构破坏,肌浆内空泡形成,部分肌纤维内见大量颗粒状物质堆积,HE染色表现为颗粒蓝染,GMR红染,PAS深染,NADH-TR染色显示脱失。电镜观察部分肌原纤维间见糖原颗粒聚集,聚集的糖原颗粒部分游离分散,但大多形成膜包绕的空腔结构。**结论:**糖原贮积症Ⅱ型是一种罕见的进展性溶酶体贮积病,由位于第17号染色体上的酸性 α -葡糖苷酶(GAA)基因突变所致,呈常染色体隐性遗传。晚发型GSDⅡ型患者临床多隐匿起病,对于疑似患者,可根据病理形态学主要受累肌肉内糖原沉积并结合电镜观察及临床表现而得出,确诊及分型则需依靠GAA酶的测定或缺陷酶热点基因突变分析。人重组 α -葡糖苷酶治疗该病,使患者预后显著改善。

关键词 糖原贮积症;临床;病理;肌肉活检**中图分类号** R741;R741.041 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2020.03.004

杜华, 钟延丰, 郑丹枫, 等. 5例晚发型糖原贮积症Ⅱ型患者的临床分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(3): 138-141.

Clinical Analysis of 5 Cases of Late-Onset Glycogen Storage Disease Type II DU Hua^{1,3}, ZHONG Yan-feng², ZHENG Dan-feng², SHI Yong-hong^{1,3}, XU Xiao-yan^{1,3}, WENG Li-xin^{1,3}, MA Xiu-mei^{1,3}, YU Hui-lin^{1,3}, SHI Ying-xu³. 1. Department of Pathology, Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010110, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medicine, Peking University, Beijing 100191, China; 3. Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010030, China

Abstract Objective: To investigate the clinicopathological features of glycogen storage disease. **Methods:** The clinical and pathological data of 5 cases of late-onset glycogen storage disease were retrospectively analyzed, and the pathological morphology, special staining, and electron microscopy were observed. **Results:** Physical examination showed that the distal and proximal extremities and the muscles of the body atrophied evenly, muscular tension of the extremities decreased to varying degrees, strength of the cervical muscles was slightly poor, and Gewer sign was positive. Serum creatine kinase (CK) levels were increased in laboratory tests. EMG showed myogenic lesions in most cases, including 3 cases accompanied by tonic discharges and aircraft dive sounds. Under light microscopy, the fascicular membranes of muscle fibers were basically intact; there was uneven staining, the structure of myofibrils was damaged, vacuoles were formed in the sarcoplasm, and a large number of granular substances were accumulated in some muscle fibers. HE showed blue granular staining, and GMR red staining, PAS deep staining, and NADH-TR staining showed color loss. Electron microscopy showed that glycogen granules were aggregated in some myofibrils and partially dispersed, but most of them formed a membrane-enclosed cavity structure. **Conclusion:** Glycogen storage disease type II is a rare progressive lysosomal storage disease that exhibits autosomal recessive inheritance due to mutation of the acid α -glucosidase (GAA) gene on chromosome 17. Late-onset GSD type II patients usually have insidious onset. For suspected patients, diagnosis and classification can be based on the glycogen deposition in the muscles most affected by pathomorphology combined with the observation of electron microscopy and clinical manifestations. The diagnosis and classification of late-onset GSD type II patients depend on determination of the GAA enzyme or mutation analysis of hot spot genes of deficient enzymes. Recombinant human α glucuronidase is used in treatment of the disease, and the prognosis of patients is significantly improved.

Key words glycogen accumulation disease; clinic; pathology; muscle biopsy

糖原贮积症(glycogen storage disease, GSD)是一组因参与糖原分解或合成代谢的酶缺乏而引起的疾病。根据所缺乏酶的不

同,目前将GSD分为11型。其中累及神经肌肉系统者主要为Ⅱ型和Ⅴ型,尤以Ⅱ型多见。GSDⅡ又称Pompe病,其糖原主要沉积

于骨骼肌、心肌和平滑肌,临床可表现为肌肉无力、心肌肥大、心功能不全等症状,严重者可因呼吸循环衰竭而死亡^[1]。GSD II 不同个体表现轻重不一,根据起病年龄、症状严重程度和进展速度不同,可分为婴幼儿型(<1岁)和晚发型(≥1岁)^[2]。其中晚发型GSD II型由于症状不典型,易与多种慢性肌病混淆。因此,提高晚发型GSD II型患者的早期诊断率就尤显重要。本组总结5例晚发型GSD II型患者的临床和病理资料,期望为患者的早期诊断和及时精准治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2011年5月至2015年4月北京大学医学部病理系经肌肉活检证实,病理诊断为晚发型GSD II患者5例,总结其临床、实验室、电生理及肌肉病理特点。

1.2 方法

1.2.1 标本获取及处理 根据临床资料和肌电图结果选取活检部位,签署知情同意后行骨骼肌开放式活检。将所取肌肉标本用耦合剂垂直固定在准备好的硬纸板上。在液氮中预冷异戊烷,不断搅拌至其出现白色结晶表示冷冻完全。之后用镊子把固定在硬纸板上的肌肉组织标本快速放入冷却的异戊烷中,并小心左右晃动组织块,冰冻约2 min,使组织块迅速充分冻结后放入液氮中。

1.2.2 组织化学、酶学染色病理分析 活检标本在(-20~-25)℃恒冷冰冻下连续切片,厚度为8~10 μm,分别进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、改良Gomori三色(modified gomori trichrome, MGT)、还原型辅酶 I-四氮唑还原酶(NADH-tetrazolium reductase, NADH-TR)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、细胞色素 C 氧化酶染色(cytochrome C oxidase, COX)、酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、腺苷三磷酸环化酶(ATPase, pH=4.35, 4.65, 9.95)、糖原PAS染色、油红O(oil red O,ORO)染色,光镜下观察。

1.2.3 免疫组化染色 进行抗肌萎缩蛋白(dystrophin, Dys)、Dys1、Dys2、Dys3免疫组织化学染色,光镜下观察。

1.2.4 透射电镜超微病理分析 标本经半薄和超薄切片,经4%戊二醛固定、磷酸缓冲液冲洗,再经1%锇酸固定,再次磷酸缓冲液冲洗,丙酮梯度脱水。醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色,透射电镜下观察。

2 结果

2.1 临床资料

本组患者中,男3例,女2例;发病年龄13~19岁,确诊年龄24~29岁。

2.1.1 临床症状 本组患者以四肢肌无力为主,双侧对称,下肢重于上肢,活动后明显。患者就诊时主诉多为上楼及蹲起困难,提重物费力,可伴抬头肌无力、吞咽硬物略困难。随着病情进展无力症状加重,并累及呼吸肌,表现为呼吸困难、憋气感等。偶有心悸,可自行缓解。

2.1.2 体格检查 四肢远近端、躯体肌肉均匀萎缩;四肢肌张力不同程度降低,颈肌力量稍差,Gewer征阳性,其他病理反射未引出。

2.1.3 实验室检查 血清肌酸激酶(creatine kinase, CK)均有不同程度升高(443~1 051 U/L),为正常参考值(38~174 U/L)的4~10倍。

2.1.4 肌电图(electromyogram, EMG) 呈肌源性损害肌电图表现,其中3例伴强直样放电,2例伴飞机俯冲声。

2.2 病理检查

2.2.1 大体检查 5例肌肉活检标本中,取自肱二头肌2例,取自股四头肌3例。送检肌肉组织面积2例为0.5 cm×0.3 cm,2例为0.5 cm×0.4 cm,1例为0.6 cm×0.4 cm。

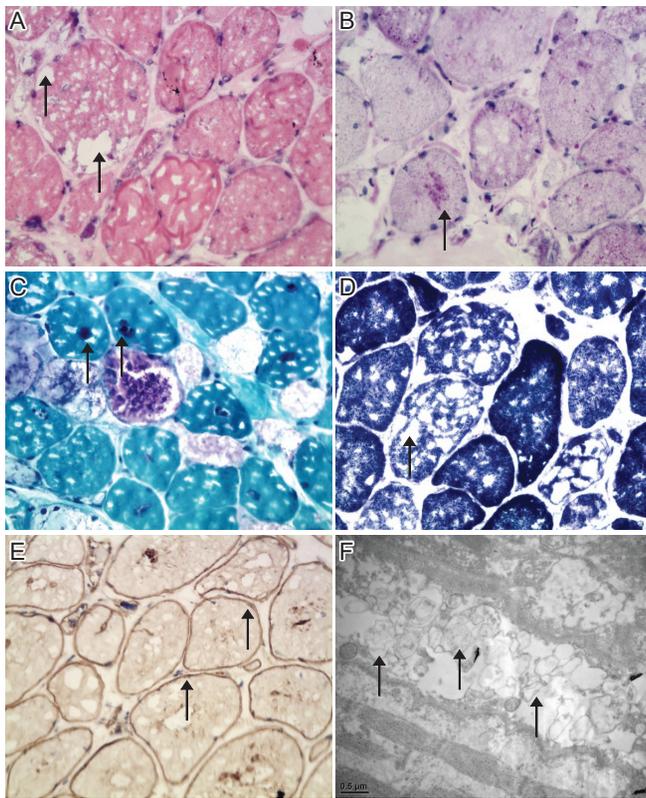
2.2.2 HE染色 光镜下肌纤维束膜基本完整,染色不均,部分肌纤维内见颗粒状物质堆积,HE表现为颗粒蓝染。肌原纤维结构破坏,肌浆内可见大量空泡形成(图1A),少数肌纤维溶解,可见再生现象。间质轻度增生,未见明显的炎症细胞浸润,血管未见显著改变。

2.2.3 特殊染色 PAS染色显示肌纤维内大量不均质性红染的糖原颗粒沉积(图1B);MGT染色中均可见空泡内大量蓝紫色颗粒样物质沉积(图1C);部分颗粒可在染色过程中脱落。ACP染色示肌纤维内ACP阳性物质明显增多,呈粗颗粒状或块状;NADH-TR染色可见肌原纤维排列紊乱,部分糖原颗粒脱失(图1D);ATPase染色示I、II型肌纤维镶嵌分布,纤维大小不一,形态不规则,可见少量萎缩、变性以及新生肌纤维,空泡样变细胞以II型纤维为主;SDH、COX染色示线粒体酶活性基本正常,ORO染色示无明显脂滴沉积。

2.2.4 免疫组化染色结果 Dys、Dys1、Dys2、Dys3均阳性(图1E),提示无抗肌萎缩蛋白抗原缺失。

2.2.5 电镜观察 部分肌纤维内肌原纤维排列整齐,肌节结构清楚,小灶状肌原纤维溶解破坏;部分肌原纤

维间见糖原颗粒聚集(图1F),糖原颗粒部分游离分散,但大多形成膜包绕的空腔结构;部分区域出现大量脂性或膜性包涵体;线粒体轻度增多,未见明显畸形及结晶体;部分肌原纤维断裂、凝聚、灶状溶解破坏。



注:A:HE染色示肌原结构纤维破坏,肌浆内可见大量空泡形成;B:PAS染色示肌纤维内见糖原颗粒沉积;C:MGT染色示空泡内大量蓝紫色颗粒样物质沉积;D:NADH-TR染色示肌原纤维排列紊乱,部分糖原颗粒脱失;E:免疫组化染色示Dys膜阳性;F:电镜观察示肌原纤维间见糖原颗粒聚集,形成膜包绕的空腔结构(20×20)

图1 患者肌肉活检染色

3 讨论

GSD II型,又称酸性麦芽糖酶缺乏症(acid maltase deficiency, AMD),1932年由荷兰病理学家Pompe首次报道,故常称为Pompe病。

3.1 病因与发病机制

麦芽糖酶包括酸性和中性麦芽糖酶两种,可分解 α -1,4糖苷键和 α -1,6糖苷键,使糖原完全消化成葡萄糖。本病为溶酶体缺乏酸性麦芽糖酶,不能分解糖原而使之沉积在溶酶体中,引起溶酶体增生,破坏甚至释放不正常的溶酶体酶而致一系列的细胞结构破坏^[3]。糖原降解障碍,沉积在骨骼肌、心肌和平滑肌细胞溶酶体内,导致细胞破坏和脏器损伤,并引起一系列临床表现。编码酸性麦芽糖酶的基因定位于17号染色体长

臂23(17q23),本病属常染色体隐性遗传,也可散发。

3.2 分型与临床表现

根据患者的发病年龄、器官受累程度和疾病进程,GSD II型分为婴儿型和晚发型两种类型。①婴儿型:症状最重,常于出生后1周至6月发病。患儿表现为呼吸窘迫,进食后发绀,四肢和全身肌无力、肌张力降低,心肌损害、心律失常、巨舌等症状和体征。本病进展迅速,常在发病后数月内死亡^[4]。②晚发型:于1岁后发病,亦可至成年期发病,主要累及躯干和四肢近端骨骼肌和呼吸肌。依据发病年龄又分为儿童型和成年型。儿童型主要表现为运动发育迟缓、四肢无力,Gower征阳性;成年型以缓慢进展的肢体近端肌无力为主,下肢较上肢明显,腰肌无力或屈髋无力可以是最早表现。呼吸肌无力十分常见^[5],约有74%的患者存在呼吸功能下降,38%表现为明显膈肌无力^[6]。心肌较少受累,部分患者可有不同程度血管病变,如胸主动脉瘤、基底动脉瘤等。也有少数患者以血管病变作为首发表现,而后才出现肌病症状^[7]。成年型患者的临床过程一般好于婴儿型和儿童型。肢带肌无力和呼吸肌无力是成年型的主要表现,翼状肩胛、股四头肌萎缩和眼睑下垂等也十分常见。本组5例晚发型GSD II型患者中,患者以四肢肌无力为主,双侧对称,下肢重于上肢,活动后明显。患者就诊时主诉多为上楼及蹲起困难,提重物费力,可伴有抬头肌无力、吞咽硬物困难等。随着病情进展无力症状加重,并累及呼吸肌,表现为呼吸困难,憋气感。偶有心悸,可自行缓解。体格检查显示四肢远近端、躯体肌肉均匀萎缩;四肢肌张力不同程度降低,颈肌力量稍差,Gewer征阳性。以上改变与文献报道^[8]基本一致。

3.3 实验室检查与病理检查

血清CK不同程度升高,本组实验中CK数值为443~1 051 U/L,为正常参考值的4~10倍。EMG示肌源性损害,其中3例伴有强直样放电,2例伴飞机俯冲声。肌肉活检示空泡性肌病^[9],PAS染色显示大多数空泡内含有糖原颗粒和酸性磷酸酶着色点。电镜下可见糖原颗粒沉积于肌膜下、肌原纤维内和溶酶体中,溶酶体增生、破坏,肌原纤维扭曲断裂。

3.4 诊断与鉴别诊断

对于GSD II型患者,根据其临床表现和肌电图改变,结合以下检查中的一种或两种,一般即可诊断。常用的检查方法有:①肌肉活检:病理特征为肌纤维呈空泡变性,空泡大小和形态各异,糖原染色阳性,溶酶体酸性磷酸酶染色呈强阳性^[10]。电镜下,肌原纤维间可

见糖原颗粒聚集,糖原颗粒部分游离分散,但大多形成膜包绕的空腔结构^[11]。②酸性 α -葡糖苷酶(acid α -glucosidase, GAA)活性测定诊断法:GAA活性测定法是一种损伤较小、操作简便的诊断方法,也是一项诊断II型GSD的金标准^[12]。③基因突变分析:GAA基因定位于q25.3,包含20个外显子,编码一条含952个氨基酸的多肽,目前已发现300余种突变类型。GSD II型呈常染色体隐性遗传,理论上必须2个等位基因均突变(纯合或杂合突变)方致病。基因学检测主要用于疑难病例或晚发型病例的诊断、已知突变家族致病基因携带者的检出及产前诊断等,在基因检测结果的判断上需严谨。近年来有学者指出,亚洲人群中GAA基因多态性位点c.1726G>A和c.2065G>A的携带率约为3.90%^[13],二者均可降低正常人血清GAA活性,但并不导致疾病的发生,为假缺陷等位基因^[14],不能单独作为GSD II型的诊断依据。

在临床上,进行性肌营养不良症、炎症性肌病、代谢性肌病、先天性肌病和累及神经-肌肉接头的肌病均可表现出GSD II型相似的近端肌无力特征,病理检查发现肌纤维内糖原贮积和空泡形成,难以鉴别诊断^[15]。因此,在诊断与鉴别诊断时,国内外专家主张多种检测方法联合应用。对于疑似GSD II型患者,可根据病理形态学主要受累肌肉内糖原沉积并结合电镜观察及临床表现而得出,确诊及分型则需依靠GAA酶的测定或缺陷酶热点基因突变分析。

3.5 治疗

长久以来,国内对GSD II型的治疗仅限于对症和支持治疗。2006年人重组酸性 α -葡糖苷酶(rhGAA)正式应用于GSD II治疗后,患者的预后明显改善^[16]。对诊断为晚发型的患者,在出现明显症状、体征前,应每隔6月评估肌力和肺功能,一旦出现肌无力和(或)呼吸功能减退或CK升高,应尽早开始酶替代治疗,可显著改善运动及呼吸功能^[17,18]。

综上所述,晚发型GSD II型患者临床多隐匿起病,表现为四肢近端肌无力,部分可伴呼吸肌受累。病理以空泡性肌病为主要特点,确诊需行GAA活性测定或基因分析。本文回顾性分析5例晚发型的GSD II型患者的遗传学、流行病学、临床、病理和代谢特征,强调了当前的治疗方法和对未来方向的影响,早期酶替代治疗可明显改善肌无力症状,延缓病情进展。患者在出

现呼吸肌受累的临床症状前得到早期诊断和早期药物干预是改善患者预后的关键,本文期望能为GSD患者的早期诊断和及时精准治疗提供一定的病理学诊断、遗传学和实验室检查依据。

参考文献

- [1] Kanungo S, Wells K, Tribett T, et al. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders[J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6: 474.
- [2] Kishnani PS, Sun B, Koeberl DD. Gene therapy for glycogen storage diseases[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28: R31-R41.
- [3] Beesley CE, Child AH, Yacoub MH. The identification of five novel mutations in the lysosomal acid α -(1-4) glucosidase gene from patients with glycogen storage disease type II. Mutations in brief no. 134 online [J]. *Hum Mutat*, 2015, 11: 413-413.
- [4] Lim J, Li L, Raben N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again[J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 177.
- [5] Chou JY, Cho JH, Kim GY, et al. Molecular biology and gene therapy for glycogen storage disease type Ib[J]. *J Inher Metab Dis*, 2018, 41: 1007-1014.
- [6] van den Berg LE, Drost MR, Schaart G, et al. Muscle fiber-type distribution, fiber-type-specific damage, and the Pompe disease phenotype [J]. *J Inher Metab Dis*, 2013, 36: 787-794.
- [7] Kishnani PS, Goldstein J, Austin SL, et al. Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [J]. *Genet Med*, 2019, 21: 772-789.
- [8] Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15: 928-942.
- [9] Reilich P, Schramm N, Schoser B, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy presenting with unusual phenotypes and atypical morphological features of vacuolar myopathy[J]. *J Neurol*, 2010, 257: 1108-1118.
- [10] Schneider J, Burmeister LA, Rudser K, et al. Hypothyroidism in late-onset Pompe disease[J]. *Mol Genet Metab Rep*, 2016, 8: 24-27.
- [11] Morales JA, Anilkumar AC. Glycogen Storage Disease Type II (Pompe Disease) [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- [12] Chan J, Desai AK, Kazi ZB, et al. The emerging phenotype of late-onset Pompe disease: A systematic literature review[J]. *Mol Genet Metab*, 2017, 120: 163-172.
- [13] Shieh JJ, Lin CY. Frequent mutation in Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect[J]. *Hum Mutat*, 1998, 11: 306-312.
- [14] Liao HC, Chan MJ, Yang CF, et al. Mass Spectrometry but Not Fluorometry Distinguishes Affected and Pseudodeficiency Patients in Newborn Screening for Pompe Disease[J]. *Clin Chem*, 2017: clinchem.2016.269027.
- [15] Clinton LJJ, Jm NO, Oliveira ASB, et al. Guidelines for the diagnosis, treatment and clinical monitoring of patients with juvenile and adult Pompe disease[J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2015, 74: 166-176.
- [16] 贺宏梅, 靳陶然, 李娜, 等. 活检骨骼肌对肌糖原累积病的诊断价值[J]. *神经损伤与功能重建*, 2014, 9: 395-398.
- [17] Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, et al. Consensus treatment recommendations for late-onset Pompe disease[J]. *Muscle Nerve*, 2012, 45: 319-333.
- [18] Messinger YH, Mendelsohn NJ, Rhead W, et al. Successful immune tolerance induction to enzyme replacement therapy in CRIM—negative infantile Pompe disease[J]. *Genet Med*, 2012, 14: 135-142.

(本文编辑:王晶)