

· Duchenne 型肌营养不良症临床研究 ·

DMD 基因点突变致 Becker 型肌营养不良症临床研究

操基清 杨娟 李亚勤 冯善伟 陈菲 郑卉 梁颖茵 赵保健 张旭 张惠丽 朱瑜龄 张成

【摘要】 研究背景 *DMD* 基因点突变,主要是无义突变,可以引起基因编码提前终止,使产生的目的蛋白不稳定而降解,导致临床症状较重的 Duchenne 型肌营养不良症,而在实际工作中可见临床表型为症状较轻的 Becker 型肌营养不良症的 *DMD* 点突变患者。本研究旨在探讨 *DMD* 基因点突变导致 Becker 型肌营养不良症的发病机制,以加深对 Becker 型肌营养不良症基因突变类型的认识。方法 共 11 例临床和肌肉活检明确诊断、多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 显示 *DMD* 基因外显子非缺失或重复突变的 Becker 型肌营养不良症患者,高通量第 2 代 DNA 测序法检测 *DMD* 基因外显子突变类型。结果 11 例 Becker 型肌营养不良症患者携带 10 种突变类型,无突变热点;6 例携带无义突变 [c.5002G>T, p.(Glu1668X); c.1615C>T, p.(Arg539X); c.7105G>T, p.(Glu2369X); c.5287C>T, p.(Arg1763X); c.9284T>G, p.(Leu3095X)]; 1 例携带错义突变 [c.5234G>A, p.(Arg1745His)]; 2 例携带框移突变 (c.10231dupT, c.10491delC); 2 例携带剪切位点突变 (c.4518+3A>T, c.649+2T>C)。结论 *DMD* 基因点突变可以引起临床症状较轻的 Becker 型肌营养不良症,当 MLPA 技术显示 *DMD* 基因为非缺失和重复突变时,切勿漏诊 Becker 型肌营养不良症,研究其发生机制对基因治疗 Duchenne 型肌营养不良症有重要借鉴意义。

【关键词】 肌营养不良,杜氏; 肌营养不良蛋白; 点突变

Clinical study of *DMD* gene point mutation causing Becker muscular dystrophy

CAO Ji-qing¹, YANG Juan¹, LI Ya-qin¹, FENG Shan-wei¹, CHEN Fei², ZHENG Hui³, LIANG Ying-yin¹, ZHAO Bao-jian⁴, ZHANG Xu⁴, ZHANG Hui-li¹, ZHU Yu-ling¹, ZHANG Cheng¹

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

²Department of Gynecology and Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong, China

³Department of Neurology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

⁴Molecular Pathology Center, Hospital Attached to Aeromedicine Institute of Chinese PLA, Beijing 100089, China

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

【Abstract】 Background *DMD* gene point mutation, mainly nonsense mutation, always cause the most severe Duchenne muscular dystrophy (DMD). However, we also observed some cases of Becker muscular dystrophy (BMD) carrying *DMD* point mutation. This paper aims to explore the mechanism of *DMD* point mutation causing BMD, in order to enhance the understanding of mutation types of BMD. **Methods** Sequence analysis was performed in 11 cases of BMD confirmed by typical clinical manifestations and muscle biopsy. The exon of *DMD* gene was detected non-deletion or duplication by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). **Results** Eleven patients carried 10 mutation

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2015.06.005

基金项目:国家自然科学基金-广东省联合基金重点资助项目(项目编号:U1032004);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:81271401);国家科技支撑计划项目(项目编号:2012BAI09B04);广东省科技计划项目(项目编号:2011A030400006)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经科[操基清(现在湖北省武汉市中心医院神经内科,邮政编码:430014),杨娟(现在南方医科大学珠江医院神经内科,邮政编码:510282),李亚勤,冯善伟,梁颖茵,张惠丽,朱瑜龄,张成];510150 广州医科大学第三附属医院妇产科(陈菲);510515 广州,南方医科大学南方医院神经内科(郑卉);100089 北京,空军航空医学研究所附属医院分子病理中心(赵保健,张旭)

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

types without mutational hotspot. Six patients carried nonsense mutations [c.5002G>T, p.(Glu1668X); c.1615C > T, p.(Arg539X); c.7105G > T, p.(Glu2369X); c.5287C > T, p.(Arg1763X); c.9284T > G, p.(Leu3095X)]. One patient carried missense mutation [c.5234G > A, p.(Arg1745His)]. Two patients carried frameshift mutations (c.10231dupT, c.10491delC). Two patients carried splicing site mutations (c.4518 + 3A > T, c.649 + 2T > C). **Conclusions** *DMD* gene point mutation may result in BMD with mild clinical symptoms. When clinical manifestations suggest the possibility of BMD and MLPA reveals non-deletion or duplication mutation of *DMD* gene, BMD should be considered. Study on the mechanism of *DMD* point mutation causing BMD is very important for gene therapy of DMD.

【Key words】 Muscular dystrophy, Duchenne; Dystrophin; Point mutation

This study was supported by Joint Fund of National Natural Science Foundation of China and Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (No. U1032004), National Natural Science Foundation of China (No. 81471280, 81271401), Supporting Program for Science and Technology Research of China (No. 2012BAI09B04) and Science and Technology Plan Project of Guangdong Province (No. 2011A030400006).

Duchenne 型肌营养不良症 (DMD) 和 Becker 型肌营养不良症 (BMD) 是 *DMD* 基因突变引起的两种预后完全不同的 X 连锁隐性遗传性肌肉病^[1-3]。前者症状较重, 是最严重的进行性肌营养不良症类型, 3~5 岁起病, 走路易跌倒, 上楼和蹲起困难, 于 12 岁前丧失独立行走能力, 约 20 岁死于呼吸和循环衰竭。后者起病较晚, 16 岁后仍能独立行走, 甚至 60 岁后仍能维持独立行走能力, 部分患者生存期接近正常^[4-5]。Duchenne 型肌营养不良症通常由 *DMD* 基因无义突变或框移突变所致, 造成肌膜抗肌萎缩蛋白 (dystrophin) 缺失, 肌肉活检几乎不能检出 dystrophin 蛋白^[6-7]。Becker 型肌营养不良症通常由 *DMD* 基因整码突变所致, 可在肌膜上产生截短的、有部分功能的 dystrophin 蛋白^[8-9]。

目前, 多重连接依赖性探针扩增 (MLPA) 或变性高效液相色谱法 (DHPLC) 可以检出 *DMD* 基因外显子缺失和重复突变, 从而发现 65%~70% Duchenne 型肌营养不良症患者的基因突变类型和 85% Becker 型肌营养不良症患者的基因突变类型, 另有约 30% 和 15% 的 Duchenne 型和 Becker 型肌营养不良症患者呈现小的缺失和重复突变, 点突变是其中主要方式^[10]。然而, *DMD* 基因点突变多为无义突变, 通常导致 Duchenne 型肌营养不良症。因此, 出现 *DMD* 基因非缺失和重复突变时, 临床医师、患者和家属易否认 Becker 型肌营养不良症的可能性, 毕竟后者临床表现与其他类型尤其是肢带型肌营养不良症 (LGMD) 相似。尽管 Becker 型肌营养不良症临床表现与其他类型尤其是肢带型肌营养不良症相似, 但在临床工作中, 我们发现部分 Becker 型肌营养不良症患者携带 *DMD* 基因点突变, 而且是无

义突变甚至框移突变。因此, 明确 *DMD* 基因点突变致 Becker 型肌营养不良症的发病机制, 可以减少漏诊率, 并对目前基因治疗 Duchenne 型肌营养不良症有重要借鉴意义。在本研究中, 我们回顾分析 11 例发生 *DMD* 基因点突变的 Becker 型肌营养不良症患者的临床资料, 结合文献对其可能的发生机制进行分析, 以提高对 Becker 型肌营养不良症基因型和临床表型之间关系的认识。

对象与方法

一、研究对象

1. 纳入标准 (1) 均符合 Flanigan 等^[11]的标准: 临床表现符合 Becker 型肌营养不良症; 肌肉活检免疫组织化学染色或免疫荧光染色显示肌膜 dystrophin 蛋白表达变化; MLPA 技术显示 *DMD* 基因外显子非缺失和重复突变。(2) 本研究经中山大学附属第一医院道德伦理委员会批准通过, 所有患者及其家属知情同意并签署知情同意书。

2. 排除标准 (1) 未行肌肉活检者。(2) MLPA 技术显示 *DMD* 基因外显子缺失和重复突变者。

3. 临床资料 选择 2007 年 8 月-2014 年 12 月在中山大学附属第一医院神经肌肉病专科门诊就诊的 Becker 型肌营养不良症患者 11 例, 均呈散发, 男性, 年龄 15~33 岁、平均 22 岁, 发病年龄 12~26 岁、平均 18 岁。临床主要表现为四肢近端肌无力, 以双下肢显著, 蹲起困难; 双侧腓肠肌肥大, 鸭步步态。实验室检查血清肌酸激酶 (CK) 水平明显升高。肌电图呈现肌源性损害。肌肉活检显示肌膜 dystrophin 蛋白表达下调或分布不均匀 (图 1)。MLPA 技术提示 *DMD* 基因外显子呈现非缺失和重

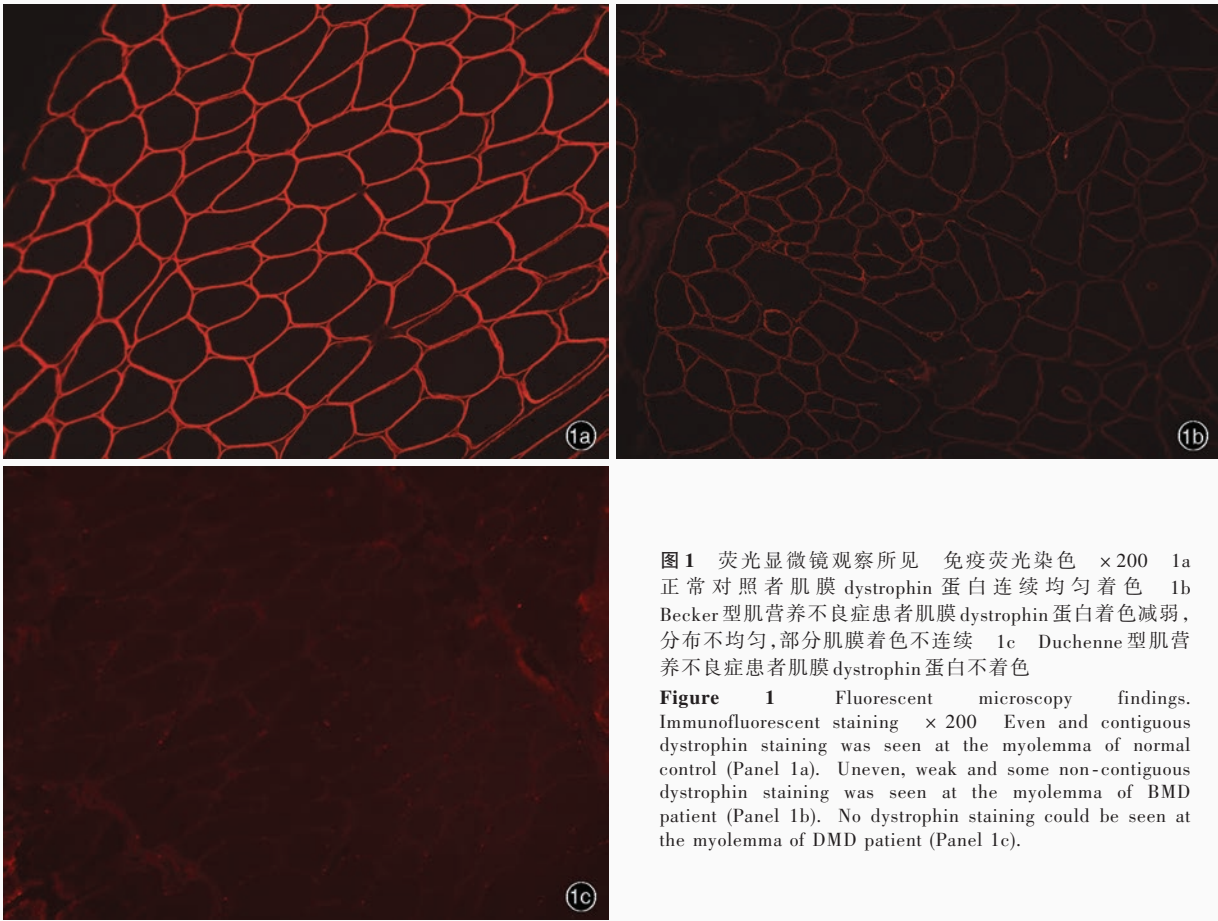


图1 荧光显微镜观察所见 免疫荧光染色 ×200 1a 正常对照者肌膜 dystrophin 蛋白连续均匀着色 1b Becker型肌营养不良症患者肌膜 dystrophin 蛋白着色减弱, 分布不均匀,部分肌膜着色不连续 1c Duchenne型肌营养不良症患者肌膜 dystrophin 蛋白不着色

Figure 1 Fluorescent microscopy findings. Immunofluorescent staining ×200 Even and contiguous dystrophin staining was seen at the myolemma of normal control (Panel 1a). Uneven, weak and some non-contiguous dystrophin staining was seen at the myolemma of BMD patient (Panel 1b). No dystrophin staining could be seen at the myolemma of DMD patient (Panel 1c).

复突变。

二、研究方法

1. DNA 提取 采集患者外周静脉血 2 ml, 采用 QIAamp DNA Blood Kits(德国 Qiagen 公司)提取基因组 DNA。

2. 文库制备 将起始量为 3 μg 的 DNA 稀释, 超声仪进行超声片段化, 约为 150 bp。采用 EpiNext™ DNA 全基因组文库制备试剂盒(美国 Illumina 公司)制备全基因组文库。片段选择产物以高保真酶行聚合酶链反应(PCR), 反应体系: 模板 DNA 20 ng, 2 U/μl Hotstart Phusion 1 μl, 100 μmol/L 上下游引物各 1 μl, 10 mmol/L dNTP 2 μl, 5 × Phusion HF buffer 20 μl, 100% 二甲基亚砜(DMSO) 5 μl, 补充双蒸水至 100 μl。反应条件: 98 °C 预变性 1 min; 98 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 7 个循环。PCR 产物以纯化磁珠纯化, 采用 NanoDrop2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司)对文库样品进行定量分析, 10 g/L 琼

脂糖凝胶电泳检测文库片段大小。

3. 目标基因捕获测序 采用 GenCap 液相捕获目标基因技术(北京迈基诺基因科技有限责任公司)对疾病相关基因区域进行捕获。针对 *FBN1* 基因 65 个外显子非重复区设计生物素标记的单链捕获探针。将 1 μg DNA 文库与 BL 缓冲液和含致病基因的生物素标记的单链捕获探针混合, 95 °C 7 min、65 °C 2 min; 加入 23 ml 预热至 65 °C 的 HY 缓冲液, 65 °C 杂交 22 h。500 μl 1× 结合缓冲液清洗 50 μl MyOne 磁珠(美国 Life Technologies 公司, ×3 次), 重悬于 80 μl 1× 结合缓冲液。加入 64 μl 2× 结合缓冲液至杂交混合物中, 转移至含 80 μl MyOne 磁珠的试管, 旋转混匀 1 h。WB1 缓冲液室温清洗磁珠 15 min, WB3 缓冲液 65 °C 清洗 15 min(×3 次)。洗脱缓冲液洗脱结合的 DNA, 进行 PCR 反应, 反应条件为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 25 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共计 15 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。严格按照 SPRI beads 试剂盒(美国 Beckman

表 1 11 例 Becker 型肌营养不良症患者 DMD 基因突变类型

Table 1. Mutation types of DMD gene in 11 patients of BMD

Case	Age (year)	Mutation type	Exon or intron	Mutation site	Pattern of dystrophin by immunohistochemistry
1	16	Nonsense	Exon 35	c.5002G > T, p. (Glu1668X)	Mosaic pattern of dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
2	16	Nonsense	Exon 14	c.1615C > T, p. (Arg539X)	Mosaic pattern of dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
3	16	Splicing	Intron 7	c.649 + 2T > C	Mosaic pattern of dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
4	25	Nonsense	Exon 49	c.7105G > T, p. (Glu2369X)	Mosaic pattern of dystrophin staining with Dys-C
5	29	Frameshift	Exon 71	c.10231dupT	Weak dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
6	15	Frameshift	Exon 74	c.10491delC	Mosaic pattern of weak dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
7	33	Splicing	Intron 32	c.4518 + 3A > T	Weak dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
8	29	Nonsense	Exon 37	c.5287C > T, p. (Arg1763X)	Weak dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
9	24	Nonsense	Exon 37	c.5287C > T, p. (Arg1763X)	Weak dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
10	18	Nonsense	Exon 63	c.9284T > G, p. (Leu3095X)	Mosaic pattern of dystrophin staining with Dys-N and Dys-C
11	19	Missense	Exon 37	c.5234G > A, p. (Arg1745His)	No dystrophin staining with Dys-C

Coulter 公司)说明书纯化 PCR 产物。富集的文库以 HiSeq2000 型测序仪(美国 Illumina 公司)进行双端测序,读取长度为 90 bp。

4. 数据分析 目标区域测序后经过滤等处理后获得数据,去除测序数据中的接头和低质量(质量值 ≥ 20)、低覆盖度(深度 ≥ 10)数据,采用 SOAPaligner 软件与参考基因组进行比对,获得单核苷酸多态性(SNP)、插入缺失突变等分析结果。同时进行测序深度、覆盖度和均一性等有效数据统计。去除 dbSNP137 数据库、千人基因组和 800 名正常汉族人基因数据库中出现的单核苷酸多态性和插入缺失突变;过滤 SIFT 预测对蛋白功能无影响的突变位点,最后获得疾病相关突变位点。

5. Sanger 测序验证 根据需要测序的 DNA 片段合成引物,行 PCR 反应,采用 ABI3730XL 测序仪(美国 ABI 公司)以 Sanger 测序法进行测序,将测序结果与目标区域捕获测序后的结果进行比对。并将测序结果在 LOVD 数据库(<http://www.lovd.nl/>)中检索,获得基因突变位点的详细信息。

结 果

本组 11 例患者共携带 10 种突变类型,分布于多个外显子,无突变热点(表 1)。6 例携带无义突变,其中 2 例呈现同一种突变,分别为外显子 35, c.5002G > T, p. (Glu1668X); 外显子 14, c.1615C > T,

p. (Arg539X); 外显子 49, c.7105G > T, p. (Glu2369X); 外显子 37, c.5287C > T, p. (Arg1763X); 外显子 63, c.9284T > G, p. (Leu3095X)。前 4 种突变位于整码外显子,表明引起 Becker 型肌营养不良症的无义突变主要位于整码外显子。2 例携带框移突变,分别为外显子 71, c.10231dupT; 外显子 74, c.10491delC。2 例携带剪切突变,分别为内含子 32, c.4518+3A > T; 内含子 7, c.649+2T > C。1 例携带错义突变,为外显子 37, c.5234G > A, p. (Arg1745His)。

本组有 8 例患者携带无义突变和框移突变,不符合基因阅读框理论,基因型与临床表型不符,提示存在其他机制调节 DMD 基因的转录和翻译,结合 2 例剪切突变和 1 例错义突变,表明 Becker 型肌营养不良症基因突变谱与 Duchenne 型肌营养不良症相互交叉,不能仅凭借 DMD 基因型判断临床表型,需结合临床表现和肌肉活检 dystrophin 蛋白表达变化综合分析。

讨 论

Becker 型肌营养不良症是 Becker 于 1953 年和 Walton 于 1955 年注意到的一种肌营养不良症^[12],与 Duchenne 型肌营养不良症一样,也是 DMD 基因突变所致。同一基因突变为何引起两种不同的临床表型和完全不同的预后? 目前可以用基因阅读框理论^[13]即 DMD 基因移码突变致 Duchenne 型肌营养

不良症、整码突变致 Becker 型肌营养不良症预测大多数 *DMD* 基因外显子缺失和重复患者的临床表型, 也可为患者家庭提供遗传咨询和产前诊断。

然而仍有约 30% 的 Duchenne 型和 Becker 型肌营养不良症患者携带 *DMD* 基因外显子非缺失和重复突变, 这给临床医师、患者和家属带来疑问。已有的基因测序结果显示, 非缺失和重复突变多为点突变^[13], 主要引起 Duchenne 型肌营养不良症。Torella 等^[14]在 153 个 *DMD* 基因非缺失和重复突变的 DNA 样本中证实 121 个 DNA 样本的突变类型(共 99 种突变), 其中 46.28% (56/121) 为无义突变, 34.71% (42/121) 为框移突变、16.53% (20/121) 为剪切突变、2.48% (3/121) 为错义突变。Tuffery-Giraud 等^[15]对 465 种明确突变位点的非缺失和重复突变进行研究, 39.78% (185/465) 为无义突变、31.83% (148/465) 为框移突变、26.88% (125/465) 为剪切突变、1.51% (7/465) 为错义突变; 而且, *DMD* 基因非缺失和重复多引起 Duchenne 型肌营养不良症^[16]。Bladen 等^[17]分析 7149 例 *DMD* 基因突变数据库发现, 1445 例为非缺失和重复突变, 其中 50.24% (726/1445) 为无义突变、33.91% (490/1445) 为框移突变、2.08% (30/1445) 为错义突变。我们课题组的研究显示, 62 例明确突变位点的非缺失和重复突变患者中 29 例 (46.77%) 为无义突变、16 例 (25.81%) 为剪切突变、10 例 (16.13%) 为框移突变、7 例 (11.29%) 为错义突变, 其中仅 11 例为 Becker 型肌营养不良症(未发表)。可以看出 *DMD* 基因非缺失和重复突变中无义突变是最主要的突变方式。

上述研究提示, 引起 Becker 型肌营养不良症的点突变主要是无义突变。无义突变导致密码子编码终止, 合成的目标蛋白多不完整且不稳定, 易降解。为何 *DMD* 基因无义突变后肌膜仍保留部分有功能的 dystrophin 蛋白? 结合相关文献, 考虑有以下原因: (1) *DMD* 基因外显子存在一种无义突变, 这种突变引起基因阅读时发生外显子跳跃而恢复阅读框^[16]。(2) 发生 *DMD* 基因突变的同时也存在基因活体镶嵌。Prior 等^[18]报告 1 例 Becker 型肌营养不良症患者, 基因测序结果显示, *DMD* 基因发生无义突变(外显子 59, 8921C>T), 并证实患者体内存在 *DMD* 基因活体镶嵌。(3) *DMD* 基因无义突变可引起其下游出现新的起始密码子, 编码截短的、有部分功能的 dystrophin 蛋白。Flanigan 等^[19]和 Magri 等^[20]报告 7 例 *DMD* 基因 5' 端 Trp3X 无义突变的 Becker

型肌营养不良症患者, 发现其 *DMD* 基因第 6 号外显子存在下游起始密码子腺嘌呤-胸腺嘧啶-鸟嘌呤 (ATG), 从而产生截短的、有部分功能的 dystrophin 蛋白。(4) *DMD* 基因内含子存在突变, 使 *DMD* 基因发生复杂且难以阐明的自我剪接方式改变, 而这种剪接方式可以产生少量正常的 dystrophin 蛋白^[16]。(5) *DMD* 基因存在一种无义突变, 发生此种突变的患者存在天然的类似 PTC124 诱导无义突变抑制作用原理的自我修复机制。尽管本研究未明确上述点突变引起 Becker 型肌营养不良症的具体机制, 但发生于整码外显子的无义突变或框移突变多是由于基因阅读时发生外显子跳跃而恢复阅读框, 进一步的研究正在进行中。

令人感兴趣的是, 本研究中错义突变外显子 37, c.5234G>A, p.(Arg1745His)^[21]与 Tuffery-Giraud 等^[15]报告的外显子 74, c.10412T>A, p.(Leu3471X) 均可引起肌膜 dystrophin 蛋白羧基末端(C 末端)丢失, 由于本研究受累外显子位于中央棒状区, 表明这种错义突变使 *DMD* 基因发生复杂且难以阐明的自我剪接方式的改变, 导致 dystrophin 蛋白 C 末端丢失。此外, Tuffery-Giraud 等^[16]研究发现, *DMD* 基因第 74 号外显子的多种无义突变和框移突变均可引起 Becker 型肌营养不良症, 提示 *DMD* 基因 C 末端氨基酸残基 3471~3500 与异连蛋白(dystrobrevin)和互生蛋白(syntrophin)结合位点对维持 dystrophin 蛋白功能是非必须的。本研究外显子 71, c.10231dupT 和外显子 74, c.10491delC 均可引起 Becker 型肌营养不良症, 进一步佐证了 Tuffery-Giraud 等^[16]的推论。

尽管目前尚未发现 *DMD* 基因点突变热点, 然而, 本研究观察到引起 Becker 型肌营养不良症的突变多位于整码外显子, 与文献报道一致。

综上所述, *DMD* 基因点突变(包括无义突变、框移突变、剪切突变、错义突变)可以通过多种机制引起 Becker 型肌营养不良症, 明确点突变引起 Becker 型肌营养不良症的机制可以为基因治疗 Duchenne 型肌营养不良症提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Emery AE. The muscular dystrophies. Lancet, 2002, 359:687-695.
- [2] Anthony K, Cirak S, Torelli S, Tasca G, Feng L, Arechavala-Gomez V, Armaroli A, Guglieri M, Straathof CS, Verschuuren JJ, Aartsma-Rus A, Helderman-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. *Brain*, 2011, 134(Pt 12):3547-3559.
- [3] Zhang C. Progress in the study on treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2007, 7:120-125. [张成. Duchenne 型肌营养不良治疗的研究进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2007, 7:120-125.]
- [4] Heald A, Anderson LV, Bushbv KM, Shaw PJ. Becker muscular dystrophy with onset after 60 years. *Neurology*, 1994, 44:2388-2390.
- [5] Ferreiro V, Giliberto F, Muñoz GM, Francipane L, Marzese DM, Mampel A, Roqué M, Frechtel GD, Szijan I. Asymptomatic Becker muscular dystrophy in a family with a multiexon deletion. *Muscle Nerve*, 2009, 39:239-243.
- [6] Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 1988, 2:90-95.
- [7] Bushby KM, Cleghorn NJ, Curtis A, Haggerty ID, Nicholson LV, Johnson MA, Harris JB, Bhattacharya SS. Identification of a mutation in the promoter region of the dystrophin gene in a patient with atypical Becker muscular dystrophy. *Hum Genet*, 1991, 88:195-199.
- [8] Winnard AV, Klein CJ, Coover DD, Prior T, Papp A, Snyder P, Bulman DE, Ray PN, McAndrew P, King W. Characterization of translational frame exception patients in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 1993, 2:737-744.
- [9] Fujii K, Minami N, Hayashi Y, Nishino I, Nonaka I, Tanabe Y, Takanashi J, Kohno Y. Homozygous female Becker muscular dystrophy. *Am J Med Genet A*, 2009, 149A:1052-1055.
- [10] Yang J, Li SY, Li YQ, Cao JQ, Feng SW, Wang YY, Zhan YX, Yu CS, Chen F, Li J, Sun XF, Zhang C. MLPA-based genotype-phenotype analysis in 1053 Chinese patients with DMD/BMD. *BMC Med Genet*, 2013, 14:29.
- [11] Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, Sampson JB, Mendell JR, Wall C, King WM, Pestronk A, Florence JM, Connolly AM, Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal KS, Wong BL, Morehart PJ, Meyer A, Finkel RS, Bonnemann CG, Medne L, Day JW, Dalton JC, Margolis MK, Hinton VJ; United Dystrophinopathy Project Consortium, Weiss RB. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat*, 2009, 30:1657-1666.
- [12] Liu ZL, Liang XL, Zhang C. *Neurogenetic diseases*. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012: 194-228. [刘焯霖, 梁秀龄, 张成. *神经遗传病学*. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 194-228.]
- [13] McClorey G, Fletcher S, Wilton S. Splicing intervention for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5: 529-534.
- [14] Torella A, Trimarco A, Blanco Fdel V, Cuomo A, Aurino S, Piluso G, Minetti C, Politano L, Nigro V. One hundred twenty-one dystrophin point mutations detected from stored DNA samples by combinatorial denaturing high-performance liquid chromatography. *J Mol Diagn*, 2010, 12:65-73.
- [15] Tuffery-Giraud S, Bérout C, Leturcq F, Yaou RB, Hamroun D, Michel - Calemard L, Moizard MP, Bernard R, Cossée M, Boisseau P, Blayau M, Creveaux I, Guiochon - Mantel A, de Martinville B, Philippe C, Monnier N, Bieth E, Khau Van Kien P, Desmet FO, Humbertclaude V, Kaplan JC, Chelly J, Claustres M. Genotype - phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD - DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat*, 2009, 30:934-945.
- [16] Tuffery - Giraud S, Saquet C, Thorel D, Dissot A, Rivier F, Malcolm S, Claustres M. Mutation spectrum leading to an attenuated phenotype in dystrophinopathies. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13:1254-1260.
- [17] Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guergueltcheva V, Chan S, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barišić N, Brabec P, Lahdetic J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, Kimura E, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J, Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannet PY, Joncourt F, Díaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloglu H, El Sherif R, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL, Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Aartsma-Rus A, Bérout C, Lochmüller H. The TREAT - NMD DMD global database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat*, 2015, 36:395-402.
- [18] Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AH, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet*, 1995, 57:22-33.
- [19] Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Howard MT, Mendell J, Connolly A, Saunders C, Modrcin A, Dasouki M, Comi GP, Del Bo R, Pickart A, Jacobson R, Finkel R, Medne L, Weiss RB. DMD Trp3X nonsense mutation associated with a founder effect in North American families with mild Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 2009, 19:743-748.
- [20] Magri F, Del Bo R, Fortunato F, Ghezzi S, Cagliani R, Sironi M, D'Angelo MG, Crugnola V, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Becker muscular dystrophy with a stop codon mutation in the 5' of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord*, 2008, 18:777-778.
- [21] Cao JQ, Zhang C, Feng SW, Yang J, Li Z, Zhang M, Li SY, Sun XF, Wang YY, Zheng MY, Kong J. Study of dystrophin gene non - deletion/duplication mutations causing Becker muscular dystrophy. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2011, 28:308-312. [操基清, 张成, 冯善伟, 杨娟, 李智, 张萌, 李少英, 孙筱放, 王艳云, 郑明纛, 孔杰. 抗肌萎缩蛋白基因非缺失/重复突变引起的 Becker 型肌营养不良症的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28:308-312.]

(收稿日期:2015-04-13)