

# 面-肩-肱型肌营养不良症研究进展史

张成 李欢

**【摘要】** 面-肩-肱型肌营养不良症(FSHD)是临床常见遗传性肌肉病,分为FSHD1型和FSHD2型。Southern blotting法是FSHD1型常用诊断方法,分子梳技术是更为简便易行的新兴检测方法。推测FSHD发病机制可能与复杂的遗传学和表观遗传学因素有关,以DUX4基因表达异常为较公认的分子学机制,而4q区域D4Z4串联重复序列整倍缺失亦参与其发生与发展。目前尚无特异性治疗方法,针对发病机制的精准治疗如毒性DUX4蛋白清除的新兴治疗方法已取得一定进展。

**【关键词】** 肌营养不良,面肩肱型; 分子诊断技术; 综述

## The history of research on facioscapulohumeral muscular dystrophy

ZHANG Cheng, LI Huan

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

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

**【Abstract】** Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is a common hereditary neuromuscular disease which is divided into FSHD1 and FSHD2. After years of research, FSHD has established complete molecular diagnostic methods, in which Southern blotting is commonly applied in the diagnosis of FSHD1, and molecular combing (MC) is a novel and simple one. The pathogenesis of FSHD is not yet fully understood, and recent studies have found that it is associated with complex genetic and epigenetic causes. At present, the most recognized molecular mechanism for FSHD is the abnormal expression of DUX4 gene. In addition, the abnormal epigenetic changes in the D4Z4 tandem repeat sequence of 4q region were involved in the pathogenesis of FSHD. There is no cure for FSHD, and some progress has been made in some precise treatment methods for its pathogenesis, such as toxic DUX4 protein removal. In this paper, the diagnosis, pathogenesis and treatment history of FSHD are summarized, so that readers understand the history and present situation of FSHD research.

**【Key words】** Muscular dystrophy, facioscapulohumeral; Molecular diagnostic techniques; Review

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81471280, 81771359), the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (No. 81601087), and 2015 Production, Study and Research Special Project of Guangzhou, Guangdong Province, China (No. 1561000153).

面-肩-肱型肌营养不良症(FSHD)是临床常见的遗传性肌肉病,以选择性、非对称性面肌、肩带肌和上臂肌群进行性肌萎缩和肌无力为临床特征,目前尚无有效治疗方法。本文对FSHD诊断与治疗及其发病机制的研究历程进行回顾,并展望未来的研

究方向。

### 一、临床诊断研究历程

早在1885年,法国神经病学家Landouzy和Dejerine<sup>[1]</sup>首次描述FSHD的临床特点:儿童期发病、累及面肌、与Duchenne型肌营养不良症(DMD)和脊髓性肌萎缩症(SMA)表现不同的进行性肌萎缩和肌无力。1950年,Tyler和Stephens<sup>[2]</sup>详细报告了一家系的临床表型和基因突变特点,并正式将其命名为“facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)”。绝大多数FSHD患者呈常染色体显性遗传,20岁后外显率高达95%<sup>[3]</sup>。根据遗传方式可分为两型,即FSHD1型和FSHD2型,其中,FSHD1型

doi: 10.3969/j.issn.1672-6731.2019.05.003

基金项目: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:81771359);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81601087);广东省广州市2015年产学研专项项目(项目编号:1561000153)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经科

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

占95%,呈常染色体显性遗传;FSHD2型占5%,遗传方式多样,可呈常染色体显性或隐性遗传。FSHD的临床表型存在高度异质性<sup>[4]</sup>,以面肌最先受累,尤其是与笑容相关的面肌在疾病早期即可发生肌无力症状,表现为闭眼不全或无力、吹口哨和鼓腮困难、唇厚而翘、表情减少等;然后逐渐出现肩带肌和上臂肌群症状且呈不对称性发病。然而,面肌无力症状通常不易察觉,至青少年期,患者多因上肢抬举无力、梳头困难而就诊。部分患者可同时存在躯干肌、骨盆带肌和下肢肌群肌无力症状,不伴心肌受累;尚可出现骨骼肌以外的症状或体征,多见于早发型病例,包括视网膜血管病变如表现为视网膜血管迂曲、闭塞、渗漏、毛细血管扩张或微动脉瘤的Coats综合征,高频(4000~6000 Hz)音域听力明显损害、智力发育迟滞、癫痫发作等。FSHD患者病程进展缓慢,一般不影响生存期,但不同程度影响生活质量,约20%的患者50岁后需以轮椅代步<sup>[5]</sup>。

## 二、分子学机制研究

1. 致病基因的定位与分子诊断 1990年,Wijmenga等<sup>[6]</sup>采用微卫星探针标记Mfd22(D4S171),经对荷兰10个FSHD家系进行连锁分析初步将FSHD致病基因定位于第4号染色体。次年,他们通过数目可变串联重复序列(VNTR)D4S139检测方法,进一步对9个FSHD家系进行多位点连锁分析和原位杂交(ISH)检测,最终将FSHD致病基因定位于第4号染色体亚端粒区(4q35-ter)<sup>[7]</sup>。此后的研究采用不同的微卫星探针,对不同种族的FSHD家系进行连锁分析,均获得与Wijmenga等<sup>[6]</sup>一致的研究结果:FSHD致病基因定位于4q35<sup>[8-9]</sup>。1992年,全球6所研究机构(包括神经病学、儿科学、遗传病学实验室)对65个FSHD家系中的504例患者和559例正常对照者的3078种基因型进行连锁分析,发现4q35区域最可能的遗传顺序为4cen-D4S171-F11-D4S163-D4S139-FSHD-tel<sup>[10]</sup>。Winokur等<sup>[11]</sup>于1993年对一种仅包含人类第4号染色体的人-仓鼠体细胞杂交细胞株,即HHW416细胞株的134个克隆进行放射性杂交分析并构建4q35物理图谱,从而确定了4q35区域15个位点(包括基因、多态位点、单态位点)的DNA排列顺序。Wijmenga等<sup>[12]</sup>于1992年从与4q35杂交的黏粒克隆13E中筛选出p13E-11探针,该探针与4q35-ter区域近端结合,探测由位于4q35区域的串联重复序列(长度为 $3.30 \times 10^3$  bp,亦称D4Z4)组成的EcoR I限制性片

段,并通过Southern blotting法(EcoR I/Hind III酶切基因组DNA与p13E-11探针杂交)检测4q35区域中与FSHD发病相关的DNA重组,结果显示,FSHD患者4q35区域存在短于正常人群的EcoR I限制性片段(长度 $< 28 \times 10^3$  bp),从此开创了FSHD的分子诊断研究。Wijmenga等<sup>[12]</sup>认为FSHD发病机制可能即与EcoR I限制性片段缺失有关。然而,常规电泳检测技术仅适用于长度 $< 50 \times 10^3$  bp的DNA片段,而无法检测全长EcoR I限制性片段。1994年,Wijmenga等<sup>[13]</sup>通过基于EcoR I/Hind III酶切基因组DNA脉冲场凝胶电泳(PFGE)联合p13E-11探针的Southern blotting法,不仅识别出长度为 $(30 \sim 320) \times 10^3$  bp的多态性DNA片段,并在所有样本中检出位于两种非等位基因座的多态性DNA片段,经单倍体型分析,一个基因座定位于4q35,另一个位于其他染色体;1995年,他们通过连锁分析将p13E-11探针识别出的非4q35区域多态性基因座定位于染色体10q-ter<sup>[14]</sup>。与Wijmenga等<sup>[12-13]</sup>同期开展分子学机制研究的还有Deidda等<sup>[15-16]</sup>,该团队的研究显示,D4Z4串联重复序列除了4q35区域还可同时存在于10q26和1q12区域,其中4q35和10q26的EcoR I限制性片段呈高度同源,但仅有来源于4q35的截短EcoR I限制性片段与FSHD的发病有关,约10%来源于10q26的EcoR I限制性片段长度 $< 38 \times 10^3$  bp,但是该片段缺失并不致病,其研究结果对FSHD分子诊断技术的准确性提出了质疑。1996年,Deidda等<sup>[17]</sup>又发现,来源于10q26的EcoR I限制性片段具有4q35未具备的Bln I限制性位点且可以被Bln I酶降解,而来源于4q35的EcoR I限制性片段具有10q26未具备的Xap I限制性位点,但是几乎不受Bln I酶的影响,仅缩短约 $3 \times 10^3$  bp,因此得知,EcoR I+Bln I双酶切基因组DNA可以避免来自10q26的截短EcoR I限制性片段的干扰,从而提高了FSHD分子诊断的准确性和可靠性。1997年,Upadhyaya等<sup>[18]</sup>在113例FSHD患者和200例正常对照者中验证了基于EcoR I+Bln I双酶切基因组DNA的Southern blotting技术的敏感性和特异性,以 $35 \times 10^3$  bp作为临界值,其灵敏度为94.6%、特异度接近100%。因此,基于EcoR I+Bln I双酶切基因组DNA脉冲场凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳联合p13E-11探针的Southern blotting法不仅可以对FSHD1A型进行有效的分子诊断,并可用于产前诊断。已知FSHD1型的发病与定位于4q35的D4Z4重

复序列整倍缺失有关,正常人群 4q35 区域中包含 11~150 个 D4Z4 拷贝数,而 95% 的 FSHD 患者 4q35 区域中仅包含 1~10 个 D4Z4 拷贝数并与其临床表型严重程度(发病年龄、疾病进展等)呈负相关, D4Z4 拷贝数越少、发病年龄越早、疾病进展越迅速、越可能出现骨骼肌以外的症状,存在 1~3 个 D4Z4 拷贝数的患者病情严重且多为散发病例,4~10 个 D4Z4 拷贝数的患者均有家族史<sup>[19-20]</sup>;此外,同一家系中 D4Z4 拷贝数通常是恒定的<sup>[21]</sup>。随着越来越多的 FSHD 家系和非典型 FSHD 分子遗传现象被报道,分子诊断技术需进一步改进。有研究显示,4q35 与 10q26 的 D4Z4 重复序列高度同源,二者易位发生率较高,有 20% 的荷兰正常人群存在 4q35 与 10q26 的同源重组,10q26 的 D4Z4 重复序列易位至 4q35,若易位后的 D4Z4 重复序列长度短于正常片段( $<38 \times 10^3$  bp)即可能致病,反之不致病<sup>[22-23]</sup>。虽然,基于 EcoR I + Bln I 双酶切基因组 DNA 脉冲场凝胶电泳联合 p13E-11 探针的 Southern blotting 技术检测 4q 与 10q 易位的准确性较高,但该方法需制备高质量的 DNA,对技术要求高,所需仪器费用昂贵,非一般实验室能够配备,使其在临床推广应用较为困难<sup>[24]</sup>。然而,常规琼脂糖凝胶电泳技术无法检出 4q 与 10q 易位,并可能存在假阳性结果。van der Maarel 团队在传统 Southern blotting 法基础上建立了 Bgl II - Bln I 剂量检测方法,经 Bgl II + Bln I 双酶切基因组 DNA 后,通过判断来自 4q 和 10q 杂交片段长度不一致,鉴别 4q 型和 10q 型 DNA 片段,如果 4q35 与 10q26 未发生易位,4q 与 10q 杂交片段信号强度比值为 2:2;若 4q 与 10q 杂交片段信号为 1:3 或 3:1,则提示 4q35 与 10q26 发生易位,该项技术在传统 Southern blotting 法基础上成功地检出了 4q35 与 10q26 易位,自此 FSHD 常规分子诊断的准确性和敏感性明显提高<sup>[25-26]</sup>。FSHD 的发病需特定的第 4 号染色体单倍体型,4q35-ter 区存在 4qA 和 4qB 两种单倍体型,二者随机出现于正常人群,但仅 D4Z4 重复序列整倍缺失的 4qA 单倍体型与 FSHD 发病有关;因此采用基于 EcoR I + Bln I 双酶切基因组 DNA 脉冲场凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳联合 p13E-11 探针的 Southern blotting 技术,再结合 4qA 或 4qB 探针即可检测两种单倍体型的表达水平<sup>[27-28]</sup>。通过检测 D4Z4 重复序列近着丝粒端的简单序列长度多态性(SSLP),可将 4q35-ter 进一步分为多种单倍体型,其中 4qA 单倍体型包括 4qA159、4qA161、4qA163、

4qA166 和 4qA168,尤以 4qA161 最为常见,而 4qA166 不致病<sup>[29-30]</sup>。总之,基于 EcoR I + Bln I 双酶切基因组 DNA 脉冲场凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳联合 p13E-11 探针的 Southern blotting 法可通过完整分离 4q 和 10q 同源性 EcoR I 区域的全部片段,从而直观分析各种复杂易位带型并判断体细胞嵌合,是目前 FSHD 分子诊断的“金标准”<sup>[24,31]</sup>。但是由于该项检测技术操作高度复杂、对实验仪器要求极高,并存在放射性污染等缺点,从而大大限制了其在临床的应用。近年来,单分子荧光原位杂交(FISH)技术,亦称为分子梳(MC),开始应用于 FSHD 的分子诊断。该项技术在 2011 年由 Nguyen 等<sup>[32]</sup>提出,是基于单分子 DNA 的荧光原位杂交技术,分辨率高达  $1 \times 10^3$  bp;可使 D4Z4 重复序列可视化,通过不同荧光标记探针单次检测即可区分 4q 或 10q 来源,以及 4qA 或 4qB 单倍体型,判断体细胞嵌合<sup>[32-34]</sup>。Vasale 等<sup>[35]</sup>分别采用传统 Southern blotting 法与分子梳技术对同一组样本进行检测,二者阳性检出率相近,但分子梳技术对判断体细胞嵌合、D4Z4 重复序列临界值,以及 Southern blotting 法模糊结果更为敏感,由于样本量较小,其结论尚待大样本临床试验加以证实。

2. FSHD1 型候选致病基因的筛选 约有 95% 的 FSHD 发病与 4q35 区域 D4Z4 重复序列整倍缺失有关,但其具体分子学机制和致病基因尚未阐明。目前在 D4Z4 重复序列内部及其邻近区域已发现多个候选致病基因,如 *DUX4*、*FRG1*、*FRG2*、*ANTI*、*DUX4C* 基因等,均与 FSHD 的发病密切相关,其中以针对 *DUX4* 基因的研究最为活跃。(1) *DUX4* 基因的发现及其作用机制: D4Z4 重复序列包含 2 个重复序列,即 LSau 和富含鸟嘌呤-胞嘧啶(GC)的低拷贝重复序列 hhsp33,以及 1 个可读框(ORF),可读框又包含 2 个同源结构域,在其上游 149 bp 处有一包含胸腺嘧啶-腺嘌呤-胞嘧啶-腺嘌呤-腺嘌呤(TACAA)框的启动子,提示 D4Z4 重复序列内可能存在功能性基因,由于该序列与双同源结构域蛋白家族序列相似,故被命名为“*DUX4*”<sup>[36-37]</sup>。2007 年,Clapp 等<sup>[38]</sup>发现 *DUX4* 基因的可读框在灵长动物基因进化过程中高度保守超过 100 万年,推测该基因可能编码功能蛋白,同时发现 *DUX4* 基因在睾丸和早期胚胎干细胞(ESCs)中呈正常表达,而在正常体细胞中不表达。同年,Kowaljow 等<sup>[39]</sup>在转染 *DUX4* 基因的小鼠肌母细胞 C2C12、人横纹肌肉瘤细胞 TE671 和原代



FSHD患者肌母细胞中检测到DUX4基因的mRNA产物,以及位于胞核、长度为 $50 \times 10^3$  bp的蛋白质产物,并发现在C2C12和TE671细胞中过表达DUX4蛋白可通过激活Caspase3/7通路或改变细胞核膜Emerin蛋白的分布而诱导细胞凋亡。尽管D4Z4重复序列的主要转录产物来源于DUX4基因,但4q35的D4Z4重复序列最远端(近端粒端)的转录产物比其他D4Z4重复序列在3'非翻译区(3'UTR)多2个内含子,其转录可延伸至D4Z4重复序列远端的pLAM区,从而在DUX4基因转录产物上增加1个多腺苷酸化信号(PAS),这种现象仅见于致病性4qA单倍体型(4qA161),与特定4qA单倍体型的致病现象相吻合;此外,体外转录自pLAM区的多腺苷酸化信号可以稳定DUX4基因转录产物,与FSHD的发病密切相关,而缺乏多腺苷酸化信号的DUX4基因逆转录产物则不稳定<sup>[40-42]</sup>。Lemmers等<sup>[42]</sup>由此提出FSHD“统一遗传模型”,认为临床表型进展的重要因素包括两方面,一是4q35的D4Z4重复序列整倍缺失导致DUX4基因表观遗传去抑制,使肌细胞DUX4基因转录异常而致病;二是存在特定4qA单倍体型,使D4Z4重复序列最远端的DUX4基因转录产物增加1个多腺苷酸化信号,DUX4基因转录产物稳定,进而表达功能性DUX4蛋白而致病。根据“统一遗传模型”理论,大量研究聚焦于DUX4基因作为FSHD致病基因的分子机制探讨。Snider等<sup>[43]</sup>采用巢式逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测FSHD患者和正常对照者的肌肉组织,以及经体外培养的原代肌肉干细胞中DUX4 mRNA表达变化,结果显示,所有携带4qA单倍体型受试者DUX4 mRNA表达均呈阳性,但无法区分患者与正常对照者;进一步的观察共发现3种DUX4基因转录本,其中两种可以产生全长DUX4蛋白,一种仅产生截短DUX4蛋白,全长DUX4蛋白来自患者,截短DUX4蛋白来自正常对照者,而且并非所有FSHD患者均表达全长DUX4蛋白。Jones等<sup>[44]</sup>对FSHD患者及其一级正常亲属进行分析,发现正常对照者肌肉组织和肌母细胞中也存在DUX4蛋白及其全长转录产物,但其表达水平明显低于FSHD患者,因此认为全长DUX4蛋白唯有达到一定水平后方可致病,提示影响全长DUX4蛋白表达及其功能的调节因子,包括家族遗传背景等也参与FSHD的发病。然而,无论是FSHD患者肌肉组织还是经体外培养的肌细胞,DUX4蛋白表达水平均较低,难以检出<sup>[45-46]</sup>。

Tassin等<sup>[45]</sup>采用免疫组织化学染色或RT-PCR法检测FSHD患者来源的肌母细胞全长DUX4蛋白表达水平,仅有1/200~1/2000的肌母细胞表达全长DUX4蛋白。上述研究提示,单纯DUX4蛋白表达异常难以解释FSHD的发病机制,DUX4基因可能通过更为复杂的机制参与疾病的发生与发展。有关DUX4基因的作用机制尚不十分明确,目前主要倾向于两种机制<sup>[46]</sup>,即全长DUX4蛋白对正常骨骼肌细胞的毒性作用;或全长DUX4蛋白作为多个基因的转录激活因子,导致部分对肌肉组织有毒性作用的蛋白过表达。DUX4蛋白的毒性作用最早见于转染DUX4基因的C2C12细胞,DUX4蛋白呈过表达的C2C12细胞凋亡率及其细胞周期凋亡标志物、细胞凋亡因子水平均明显升高<sup>[38,47]</sup>;与此同时,由DUX4蛋白诱导的细胞凋亡还可见于FSHD患者肌肉组织,以及斑马鱼、果蝇、小鼠模型肌肉组织和其他组织中<sup>[48-51]</sup>。采用小干扰RNA(siRNA)下调FSHD患者肌管细胞中全长DUX4蛋白表达,可降低细胞凋亡率<sup>[52]</sup>。DUX4蛋白可通过激活Caspase3、上调p53相关基因和p21基因表达而诱导细胞凋亡<sup>[38,53-54]</sup>。有研究显示,DUX4蛋白是多个基因的转录激活因子,这些基因在FSHD患者肌肉组织中的表达高于DUX4蛋白,绝大多数基因的转录产物均存在DUX4基因结合位点,提示DUX4蛋白可能通过影响其他基因的表达变化,参与FSHD的发病,同时也为部分患者肌肉组织DUX4蛋白水平较低仍可致病提供可能的解释<sup>[40,47,55-56]</sup>。成对同源结构域转录因子1(PITX1)基因是首个被报道的DUX4靶基因,2007年Dixit等<sup>[40]</sup>发现,FSHD患者肌肉组织DUX4基因和PITX1基因表达水平明显升高,其中PITX1蛋白水平是正常对照者的10~15倍;而且其体外实验还观察到,DUX4基因瞬时表达即可激活PITX1基因启动子并特异性与其中的顺式元件相互作用,上调PITX1基因表达,提示DUX4蛋白是PITX1基因的转录激活因子,DUX4基因转录产物通过激活PITX1基因而在FSHD的发病机制中发挥重要作用。通过基因芯片技术检测经体外培养的过表达DUX4基因的肌母细胞或FSHD患者肌母细胞mRNA,DUX4基因转录产物可上调或下调多条信号转导通路,包括Wnt介导的炎症反应通路、骨形态发生蛋白(BMP)介导的成肌分化通路、核因子NF-E2相关因子2(Nrf2)介导的氧化应激通路等,导致正常细胞功能失调,诱发FSHD<sup>[57-58]</sup>。Tapscott团队通过RNA测序

技术,观察 DUX4 蛋白作为多个基因的转录激活因子所致其他基因在 FSHD 患者肌肉组织中的表达变化,上述结果进一步支持 DUX4 基因在发病机制中发挥重要作用的学说<sup>[59-60]</sup>。遗憾的是,目前构建的 DUX4 基因动物模型均未模拟出典型 FSHD 的临床症状。Wallace 等<sup>[53]</sup>以腺相关病毒 6(AAV6)为载体,于模型小鼠胫骨前肌转染 DUX4 基因诱导 DUX4 蛋白过表达,1 周后可见肌纤维损害和炎性细胞浸润现象,但模拟损害维持时间很短,3 周后随着 DUX4 基因载体的消耗,其病理改变即恢复正常。Krom 等<sup>[61]</sup>构建的携带人 4qA 单倍体 D4Z4 重复序列的转基因小鼠模型,分别包含 2.5 个 D4Z4 拷贝数(D4Z4-2.5 小鼠)和 12.5 个 D4Z4 拷贝数(D4Z4-12.5 小鼠),小鼠出生后即在 D4Z4-2.5 小鼠生殖细胞和体细胞内检出 DUX4- $\beta$  蛋白,并观察到与 FSHD 患者相似的 D4Z4 重复序列低甲基化的表观遗传学改变,但未见肌无力和肌萎缩症状,以及肌肉组织病理改变。另一项研究将多西环素诱导的 DUX4 转基因导入小鼠 X 染色体常染色质区,该基因长度为  $2.70 \times 10^3$  bp,包含 DUX4- $\beta$  基因可读框和 4qA 单倍体末端 D4Z4 重复序列 3'UTR,可于构建的 iDUX4(2.7)小鼠体细胞中检测到 DUX4- $\beta$  基因转录产物,雄性携带小鼠仅存活 2 个月且出现皮肤和视网膜损害,而雌性携带小鼠症状很轻微,与 D4Z4-2.5 小鼠相比,iDUX4(2.7)小鼠则表现为肌无力和肌容积减小,但未见 FSHD 样症状<sup>[62]</sup>。总之,DUX4 基因表达异常是目前公认的 FSHD 的分子学发病机制,但具体作用机制尚未阐明,有待对相关动物模型做进一步探索。(2)FSHD1 型其他候选致病基因的研究:1994 年,Winokur 等<sup>[63]</sup>发现 D4Z4 重复序列位于 4q 近端粒异染色质内,进而提出“FSHD 致病基因位置效应变异(PEV)”学说,即 4q 近端粒异染色质内 D4Z4 重复序列整倍缺失可导致该区域与常染色质区之间的缓冲带缩短,从而影响邻近基因的表达。这一学说引导了部分在 D4Z4 重复序列相邻区域寻找 FSHD 致病基因的研究。1996 年,van Deutekom 等<sup>[64]</sup>首次提出 FRG1 基因可能是 FSHD 致病基因的观点,该基因定位于 D4Z4 重复序列上游近着丝粒端  $100 \times 10^3$  bp 处,编码一种高度保守的核蛋白,参与前信使 RNA(pre-mRNA)的剪接。正常情况下,FRG1 蛋白表达于包括骨骼肌在内的多种组织,在脊椎动物和无脊椎动物肌肉发育过程中发挥重要作用<sup>[65-66]</sup>。但 FRG1 蛋白在 FSHD 患者与正常对照

者肌肉组织中的表达差异尚存争议<sup>[67-70]</sup>。2006 年,Gabellini 等<sup>[71]</sup>构建 FRG1 转基因小鼠模型,其肌肉组织 FRG1 基因表达水平是正常小鼠的 24~45 倍。该项研究以及后续研究均显示,FRG1 转基因小鼠可出现与 FSHD 表型相似的临床症状(如过表达 FRG1 基因诱导的肌膜完整、血清肌酸激酶正常的进行性肌营养不良症)和运动耐受能力下降,特定的肌纤维萎缩和肌球蛋白重链(MyHC)阳性细胞异常聚集<sup>[71-73]</sup>,以及肌肉生长与再生障碍<sup>[74]</sup>;且 FRG1 蛋白表达水平越高、小鼠肌无力症状越严重<sup>[74]</sup>,提示高表达的 FRG1 蛋白引起的特定基因 pre-mRNA 异常剪接,可能是 FSHD 的发病机制。动物实验和体外研究观察到的 FRG1 转基因小鼠肌细胞存在 *Mtmr1* 和 *Tnnt3* 基因异常剪接的现象,同样与其他肌营养不良症的发病有关<sup>[71]</sup>。其中,*Tnnt3* mRNA 异常剪接与 FSHD 的关系最为密切,FRG1 转基因小鼠 *Tnnt3* mRNA 异常剪接产生的异常蛋白异构体可损伤肌细胞的收缩特性,且该蛋白异构体对 II 型肌纤维的影响较 I 型肌纤维更加显著,这也与 FSHD 肌肉组织的病理改变相似,*Tnnt3* mRNA 异常剪接致蛋白变异越显著、临床表型越严重<sup>[75]</sup>。另外,有研究显示 FRG1 蛋白可通过下调剪接因子 Rbfox1 蛋白的表达,引起钙蛋白酶 3(*calpain3*)基因 mRNA 异常剪接发挥其致病性<sup>[73]</sup>;而且过表达 FRG1 蛋白还可导致表观遗传调节因子 Suv4-20H1 蛋白出现更广泛的核分布,抑制肌母细胞分化<sup>[76]</sup>。*FAT1* 基因是 *FAT* 基因家族成员,定位于 D4Z4 重复序列近着丝粒端约  $3.30 \times 10^6$  bp 处,编码相对分子质量为  $506 \times 10^3$  的跨膜蛋白,该蛋白与细胞迁移、抑制细胞增殖等有关<sup>[77]</sup>。2013 年,Caruso 等<sup>[78]</sup>发现 FAT1 蛋白缺失的小鼠呈现与 FSHD 相似的选择性肌肉受累的肌肉病表现和肌肉组织以外的症状,认为是 FAT1 蛋白通过调控肌母细胞迁移极性而影响肩带肌和面部肌肉的发育。他们还发现,FSHD1 型患胎(流产的胎儿)肌肉组织 FAT1 蛋白和 *FAT1* mRNA 表达水平低于对照者(流产的非肌肉病胎儿),但成人 FSHD1 型患者肌肉组织 FAT1 蛋白表达水平与对照者无明显差异,且部分不携带 D4Z4 重复序列整倍缺失的 FSHD 患者存在 *FAT1* 基因或其调节区基因突变,表明 FAT1 蛋白表达下调或者缺失可能与 FSHD 发病有关<sup>[78]</sup>。在 Puppo 等<sup>[79]</sup>观察的 49 例日本 FSHD 病例中,无一例出现 4q35 区域 D4Z4 重复序列缺失、低甲基化和 *SMCHD1* 基因突变,但有 10 例患者存在

*FAT1* 基因致病突变,提示 *FAT1* 基因可能与 FSHD 的发病有关。然而, Mariot 等<sup>[80]</sup>认为, FSHD 早期受累肌肉 *FAT1* 基因表达水平低于晚期受累肌肉, 成年患者肌肉组织 *FAT1* 基因表达水平低于正常对照者, 但 *FAT1* 基因表达变化与 DUX4 蛋白无关联性, 所得结果与 Caruso 等<sup>[78]</sup>的不尽一致。Park 等<sup>[81]</sup>于 2018 年报告 1 例 FSHD1 型患者的基因分析结果, 提示存在 *FAT1* 基因突变, 该基因可能为 FSHD 的修饰基因。目前关于 *FAT1* 基因与 FSHD 关系的研究较少, 尚无法提供更多的实验证据。尽管有学者也对 *FRG2*、*ANTI* 和 *DUX4C* 基因与 FSHD 发病的关系进行探讨, 但这 3 个基因的动物模型均未出现 FSHD 样肌无力和肌萎缩症状<sup>[46]</sup>, 故其作为 FSHD1 型候选致病基因的可能性较小。

3. 表观遗传学研究 FSHD1 型和 FSHD2 型患者均存在 D4Z4 重复序列 CpG 岛低甲基化, 以及组蛋白抑制性修饰缺失的表观遗传学改变, 例如组蛋白 H3 赖氨酸 9 三甲基化(H3K9me3)缺失, 表明表观遗传学与 FSHD 的发病机制有关<sup>[82-83]</sup>。据研究显示, 4q35 区域 D4Z4 重复序列可能存在异染色质的沉默, 该序列的缩短与局部染色体序列去抑制引起的基因异常表达有关<sup>[63,84]</sup>; 缩短的 D4Z4 重复序列可能通过多个表观遗传因子影响组蛋白修饰、位置效应变异、DNA 甲基化, 导致局部异染色质结构开放, 从而表达异常蛋白<sup>[46]</sup>。Gabellini 等<sup>[68]</sup>在 D4Z4 重复序列中发现一由 27 个碱基对组成的区域即 D4Z4 结合元件(DBE), D4Z4 结合元件可以募集数个与组蛋白表达相关的调节因子如 YY1/HMGB2/nucleolin 组成的蛋白复合体, 该复合体通过结合 D4Z4 重复序列以调节 4q35 区域基因的转录抑制, D4Z4 拷贝数越少、转录抑制作用越弱。Bodega 等<sup>[67]</sup>的研究也进一步证实上述结论, 同时还发现另一个 D4Z4 结合元件。Cabanca Daphne 等<sup>[85]</sup>认为, 4q35 区域的基因表达可能受多梳抑制复合体(PRC)的调节, 该复合体与 p13E-11 区域和 D4Z4 重复序列的多个位点结合, 通过下调多梳抑制复合体的表达以减轻上述结合区域的抑制状态, 他们提出一种模型, 即 FSHD 患者 4q35 区域 D4Z4 拷贝数减少致多梳抑制复合体结合位点减少, 从而在 D4Z4 结合元件区域产生一种较长的非编码 RNA——DBE-T, DBE-T 通过募集相关蛋白而影响 4q35 区域的基因表达。DNA 5' 端胞嘧啶甲基化是一种常见的 DNA 修饰, 与染色质和表观遗传沉默有关<sup>[86]</sup>。D4Z4 重复序列异常甲基化

也参与 FSHD 的发病, 每个 D4Z4 重复序列包含 1 个 CpG 岛, 正常人脑组织、肝脏和肌肉组织中的 D4Z4 重复序列 CpG 岛均呈高度甲基化, 提示 D4Z4 重复序列表达抑制, 而睾丸组织 D4Z4 重复序列 CpG 岛呈低甲基化, 与正常人睾丸组织 D4Z4 重复序列相一致<sup>[43]</sup>。van Overveld 等<sup>[87]</sup>采用甲基化敏感的限制酶切法证实了 FSHD1 型患者 4q35 区域 D4Z4 重复序列的甲基化程度低于正常对照者, 同时发现有 FSHD 临床表现但无 4q35 区域 D4Z4 重复序列整倍缺失的患者也存在 D4Z4 重复序列低甲基化, 提示 D4Z4 重复序列低甲基化可能与 FSHD 的发病有关。进一步研究显示, D4Z4 拷贝数少、病情严重的患者, 其 D4Z4 重复序列甲基化程度较低<sup>[88-89]</sup>。Lemmers 等<sup>[90]</sup>发现, D4Z4 重复序列甲基化程度与其拷贝数不成比例, D4Z4 拷贝数小于阈值(<7 个)时, 其甲基化程度显著降低。Huichalaf 等<sup>[91]</sup>采用亚硫酸氢盐测序法对 D4Z4 重复序列及其更大延伸区域的所有 CpG 岛位点甲基化程度进行检测, 发现不同 4q35 区域的甲基化程度各异, 近端粒端的甲基化程度高于近着丝粒端, 由此认为, D4Z4 重复序列甲基化程度与疾病严重程度具有相关性。Jones 等<sup>[92-93]</sup>采用同样的检测方法亦发现 FSHD 患者的 4qA 单倍体近端粒端 D4Z4 重复序列甲基化程度低于正常对照者。

4. FSHD2 型发病机制研究 FSHD1 型与 FSHD2 型临床表现相似, 单纯依靠临床表现难以进行鉴别。与 FSHD1 型不同的是, 大多数 FSHD2 型为新发突变, FSHD1 型呈常染色体完全显性遗传, FSHD2 型遗传方式复杂, 有家族史的家系既可呈显性亦可呈隐性遗传<sup>[94-95]</sup>。FSHD2 型无 4q35 区域 D4Z4 重复序列的整倍缺失, 其 D4Z4 重复序列长度与病情严重程度无关, 但是 FSHD2 型患者存在至少 1 条特定 4qA 单倍体型<sup>[96-97]</sup>。FSHD1 型和 FSHD2 型均存在特定染色体区域的低甲基化和组蛋白修饰改变, 不同的是, FSHD1 型的表观遗传学改变仅发生在 4q 的 D4Z4 重复序列, 而高度同源的 10q 的 D4Z4 重复序列无改变; FSHD2 型的表观遗传学改变则同时发生在 4q 和 10q 的 D4Z4 重复序列<sup>[87,94,98]</sup>。2012 年, Lemmers 等<sup>[96]</sup>对 19 个无血缘关系的 FSHD2 型家系进行全外显子组测序(WES), 其中 15/19 个家系携带第 18 号染色体的 *SMCHD1* 基因杂合致病突变, 这些患者肌细胞 SMCHD1 蛋白水平低于正常对照者, 该蛋白表达降低程度与 D4Z4 重复



序列低甲基化程度相一致,此外,同时携带 *SMCHD1* 基因突变和 4qA 单倍体型的患者可在其肌肉组织中检出 DUX4- $\beta$  蛋白表达异常,由于 D4Z4 重复序列存在 *SMCHD1* 蛋白结合位点,而 FSHD2 型患者该位点缺失且部分敲除该基因后则可出现 D4Z4 重复序列去抑制,因此他们首次提出 *SMCHD1* 基因是 D4Z4 重复序列的表观调节因子的学说,即 FSHD2 型的致病基因。一项大样本 FSHD2 型家系研究结果显示,约 85% 的患者存在 *SMCHD1* 基因突变,且突变类型及其所在基因位点不同、D4Z4 重复序列甲基化程度不同,病情严重程度也有所不同<sup>[90,99]</sup>;少数 FSHD2 型患者与第 20 号染色体 *DNMT3B* 基因突变有关,*DNMT3B* 基因突变同样可出现 D4Z4 重复序列低甲基化,并导致同时携带 4qA 单倍体型的患者出现 FSHD 样表现<sup>[46,100]</sup>。

### 三、治疗研究

目前,FSHD 尚无根治方法。低强度的有氧运动可以提高肌力和改善生活质量,尽管多项临床试验对糖皮质激素<sup>[101]</sup>,钙通道阻断药地尔硫草<sup>[102]</sup>、沙丁胺醇<sup>[103-104]</sup>,氧化应激抑制剂维生素 C、维生素 E、硒代甲硫氨酸、锌剂<sup>[105]</sup>,肌肉生长抑制素(myostatin)抑制剂<sup>[106]</sup>等药物疗效进行研究,但至今尚未取得有效成果。近年,随着 FSHD 分子机制的研究进展,分子治疗开始关注 DUX4- $\beta$  蛋白和 *FRG1* 蛋白功能抑制与清除。

*DUX4* 基因是目前最有可能的 FSHD 致病基因,针对其治疗策略成为研究热点。通过 siRNA 清除 *DUX4* 基因的尝试首先在经体外培养的 FSHD 肌母细胞中进行,Lim 等<sup>[107]</sup>设计了一系列靶向 D4Z4 重复序列的 *DUX4* 基因编码区、3' 非编码区(3'NCR)和 *DUX4* 基因启动子的 siRNA,动物实验结果显示,靶向 *DUX4* 基因编码区和 *DUX4* 基因启动子的 siRNA 可以有效降低 *DUX4* 基因及其靶基因表达水平,靶向 *DUX4* 基因启动子的 siRNA 可以提高局部区域的甲基化程度,提示 siRNA 可以改变表观遗传沉默的 *DUX4* 基因。Wallace 等<sup>[108]</sup>于小鼠胫骨前肌局部肌肉注射以 AAV6 为载体的过表达 *DUX4- $\beta$*  基因和靶向 *DUX4- $\beta$*  基因的 AAV6 siRNA,证实 siRNA 在体内沉默 *DUX4- $\beta$*  基因的表达是可行的,同时可以改善小鼠 DUX4- $\beta$  蛋白导致的肌肉组织病理改变。

此外,采用反义寡核苷酸(ASO)如吗啉寡核苷酸(MOS)和磷酸二酰胺吗啉低聚物(PMO),可在空间上阻止翻译或干扰靶 RNA 剪接以抑制 *DUX4* 基因

表达<sup>[109-111]</sup>。将针对 *DUX4* 基因 pre-mRNA 的多腺苷酸化信号位点的 MOS 作用于 FSHD 肌管细胞,可显著下调 *DUX4* 基因下游的 DUX4 蛋白靶基因表达,表明 ASO 能够有效沉默 DUX4- $\beta$  蛋白<sup>[109-111]</sup>;或将成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/dCas9 系统作用于 FSHD 肌母细胞 *DUX4* 基因启动子,同样可以抑制 DUX4- $\beta$  蛋白及其下游 DUX4 蛋白靶基因表达<sup>[112]</sup>。总之,目前有多种方法可以抑制 DUX4- $\beta$  蛋白的表达,但大多处于体外实验阶段,期待尽早获得令人鼓舞结果。

*FRG1* 基因在 FSHD 患者肌肉组织中呈异常高表达。在 *FRG1* 转基因小鼠模型中,通过靶向 *FRG1* 基因的 siRNA 或短发卡 RNA(shRNA)抑制 *FRG1* 基因功能,可以显著增强小鼠肌力和肌容积、减轻肌肉组织病理损害<sup>[113-114]</sup>;通过上调 *FRG1* 蛋白抑制剂 FHL1 蛋白表达以抵消 *FRG1* 蛋白的作用,过表达 FHL1 蛋白同样可以改善小鼠肌肉组织病理损害,增加肌容积<sup>[115]</sup>。

### 四、国内分子诊断研究历程

1955 年,北京协和医院谭铭勋<sup>[116]</sup>对 33 例进行性肌营养不良症患者的临床特点进行了详细分析,其中 8 例为 FSHD,此为国内首次系统报道肌营养不良症的临床研究。1983 年,四川医学院附属医院(现为四川大学华西医院)徐文桢等<sup>[117]</sup>报告一家系共 19 例患者,均呈常染色体显性遗传。2001 年,中山大学附属第一医院曾缨和张成<sup>[118]</sup>成功采用基于 *EcoR* I + *Bln* I 双酶切基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳联合 p13E-11 探针的 Southern blotting 法对我国 FSHD 患者进行基因诊断和症状前诊断,此为国内开展的首例基因诊断试验;2002 年,中山大学附属第一医院张成教授与日本国家神经科学研究所、Toneyama 国立医院、东京医科大学和韩国大田生物医学株式会社合作,通过 *Bgl* II - *Bln* I 剂量检测方法对 114 名健康中国人、153 名健康日本人、124 名健康韩国人和 56 例日本 FSHD 患者的 4q 与 10q 易位情况进行检测,结果显示,4q 与 10q 易位发生率与种族无关,而且 4q 易位至 10q 的发生率高于 10q 易位至 4q<sup>[119]</sup>。次年,中山大学附属第一医院苏全喜等<sup>[120]</sup>和福建医科大学附属第一医院王柠等<sup>[121]</sup>以同样方法在我国 FSHD 患者和正常人群中成功检测到 4q35 与 10q26 易位,发现中国人群 4q35 和 10q26 易位发生率与国外相近。同年,福建医科大学附属第一医院王志强等<sup>[122]</sup>通过基于脉冲场凝胶电泳的

Southern blotting 法对我国 FSHD 患者进行基因诊断, 结果发现易位、杂合、体细胞嵌合等复杂现象。2006 年, 福建医科大学陈中杰<sup>[123]</sup>采用基于脉冲场凝胶电泳联合 4qA/4qB 探针的 Southern blotting 法, 对我国 FSHD 患者 4q35-ter 区域等位基因 4qA 和 4qB 结构特征进行探讨, 为第 4 号染色体单倍体的分布提供了较为翔实的数据。自此, 我国 FSHD 分子诊断技术不断进步, 由于基于脉冲场凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳的 Southern blotting 技术操作难度较大、放射性污染较为严重, 国内学者开始致力于开发并推广更加简便易行的分子诊断方法。2007 年, 中山大学附属第一医院李婉仪<sup>[124]</sup>建立了可快速诊断 FSHD 的实时荧光定量 PCR 技术, 其准确性和敏感性与传统 Southern blotting 法相近, 但较好地解决了耗时、费力、放射性污染等问题, 同时能够检出 4q35 与 10q26 易位、探针结合部位缺失等非典型患者。此后, 福建医科大学附属第一医院苏全喜等<sup>[125-126]</sup>进一步对实时荧光定量 PCR 技术的反应条件进行改进, 使其检测准确性有所提高。至 2018 年, 广州嘉检医学有限公司张巍、中山大学附属第一医院张成以及复旦大学附属华山医院朱雯华等首次采用分子梳技术诊断 FSHD 并获得成功, 与传统检测方法相比较, 分子梳技术更加简便、易行, 适于临床推广应用<sup>[34]</sup>。

### 五、总结与展望

FSHD 既往被认为是简单的、临床表型特异的常染色体显性遗传性肌肉病, 随着近年分子遗传学、表观遗传学、细胞水平研究技术的不断提高与进步, 已证实 FSHD 是具有较为复杂分子遗传学机制的肌肉病。基于脉冲场凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳的 Southern blotting 技术是目前诊断 FSHD 的“金标准”, 新近发展的分子梳技术简便、实用, 易于在临床推广应用。*DUX4* 基因异常表达是目前较为公认的分子学机制, 但其发病机制和动物模型尚待进一步研究。随着 FSHD 分子学机制的进展, 必将出现新的治疗方法。

综上所述, 尽管 FSHD 在发病机制、诊断方法已取得长足进步, 但仍有诸多问题亟待解决, 其治疗方法亦需更多的深入研究。我国已经成立了 FSHD 病友会和专家协作组, 通过了解疾病历史和现状, 找出突破点, 在政府相关部门、临床专家和病友们的共同努力下, 有望促进我国 FSHD 研究的发展。

利益冲突 无

### 参 考 文 献

- [1] Landouzy L, Dejerine J. De la myopathie atrophique progressive [J]. Rev Med Franc, 1885, 5:81-253.
- [2] Tyler FH, Stephens FE. Studies in disorders of muscle: clinical manifestations and inheritance of facioscapulohumeral dystrophy in a large family [J]. Ann Intern Med, 1950, 32:640-660.
- [3] Lunt PW, Compston DA, Harper PS. Estimation of age dependent penetrance in facioscapulohumeral muscular dystrophy by minimizing ascertainment bias [J]. J Med Gene, 1989, 26:755-760.
- [4] Liu ZL, Liang XL, Zhang C. Neurogenetic diseases [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 228-234. [刘焯霖, 梁秀龄, 张成. 神经遗传病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 228-234.]
- [5] Pastorello E, Cao M, Trevisan CP. Atypical onset in a series of 122 cases with facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2012, 114:230-234.
- [6] Wijmenga C, Frants RR, Brouwer OF, Moerer P, Weber JL, Padberg GW. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4 [J]. Lancet, 1990, 336:651-653.
- [7] Wijmenga C, Padberg GW, Moerer P, Wiegant J, Liem L, Brouwer OF, Milner EC, Weber JL, van Ommen GB, Sandkuyl LA, Frants RR. Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization [J]. Genomics, 1991, 9:570-575.
- [8] Mills KA, Buetow KH, Xu Y, Ritty TM, Mathews KD, Bodrug SE, Wijmenga C, Balazs I, Murray JC. Genetic and physical mapping on chromosome 4 narrows the localization of the gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51:432-439.
- [9] Weiffenbach B, Bagley R, Falls K, Hyser C, Storvick D, Jacobsen SJ, Schultz P, Mendell J, Willems van Dijk K, Milner EC, Griggs R. Linkage analyses of five chromosome 4 markers localizes the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) gene to distal 4q35 [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51:416-423.
- [10] Sarfarazi M, Wijmenga C, Upadhyaya M, Weiffenbach B, Hyser C, Mathews K, Murray J, Gilbert J, Pericak-Vance M, Lunt P, Frants RR, Jacobsen S, Harper PS, Padberg GW. Regional mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on 4q35: combined analysis of an international consortium [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51:396-403.
- [11] Winokur ST, Schutte B, Weiffenbach B, Washington SS, McElligott D, Chakravarti A, Wasmuth JH, Altherr MR. A radiation hybrid map of 15 loci on the distal long arm of chromosome 4, the region containing the gene responsible for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) [J]. Am J Hum Genet, 1993, 53:874-880.
- [12] Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuyl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R, van Ommen GJ, Padberg GW, Frants RR. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. Nat Genet, 1992, 2:26-30.
- [13] Wijmenga C, van Deutekom JC, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR. Pulsed-field gel electrophoresis of the D4F104S1 locus reveals the size and the parental origin of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)-associated deletions [J]. Genomics, 1994, 19:21-26.
- [14] Bakker E, Wijmenga C, Vossen RH, Padberg GW, Hewitt J,



- van Der Wielen M, Rasmussen K, Frants RR. The FSHD - linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter[J]. *Muscle Nerve Suppl*, 1995, 18:S39-44.
- [15] Deidda G, Cacurri S, La Cesa I, Scoppetta C, Felicetti L. 4q35 molecular probes for the diagnosis and genetic counseling of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 1994, 36:117-118.
- [16] Deidda G, Cacurri S, Grisanti P, Vigneti E, Piazzi N, Felicetti L. Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter[J]. *Eur J Hum Genet*, 1995, 3:155-167.
- [17] Deidda G, Cacurri S, Piazzi N, Felicetti L. Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy[J]. *J Med Genet*, 1996, 33:361-365.
- [18] Upadhyaya M, Maynard J, Rogers MT, Lunt PW, Jardine P, Ravine D, Harper PS. Improved molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): validation of the differential double digestion for FSHD [J]. *J Med Genet*, 1997, 34:476-479.
- [19] Goto K, Lee JH, Matsuda C, Hirabayashi K, Kojo T, Nakamura A, Mitsunaga Y, Furukawa T, Sahashi K, Arahata K. DNA rearrangements in Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients: clinical correlations [J]. *Neuromuscul Disord*, 1995, 5:201-208.
- [20] Ricci E, Galluzzi G, Deidda G, Cacurri S, Colantoni L, Merico B, Piazzi N, Servidei S, Vigneti E, Pasceri V, Silvestri G, Mirabella M, Mangiola F, Tonali P, Felicetti L. Progress in the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy and correlation between the number of KpnI repeats at the 4q35 locus and clinical phenotype [J]. *Ann Neurol* 1999, 45: 751-757.
- [21] Lunt PW; 44th ENMC International Workshop. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: molecular studies 19-21 July 1996, Naarden, The Netherlands [J]. *Neuromuscul Disord*, 1998, 8:126-130.
- [22] Lemmers RJ, van der Maarel SM, van Deutekom JC, van der Wielen MJ, Deidda G, Dauwerse HG, Hewitt J, Hofker M, Bakker E, Padberg GW, Frants RR. Inter - and intrachromosomal sub - telomeric rearrangements on 4q35: implications for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) aetiology and diagnosis [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 1207-1214.
- [23] van Overveld PG, Lemmers RJ, Deidda G, Sandkuijl L, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Interchromosomal repeat array interactions between chromosomes 4 and 10: a model for subtelomeric plasticity [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9:2879-2884.
- [24] van Deutekom JC, Bakker E, Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bik E, Hofker MH, Padberg GW, Frants RR. Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counseling and etiology of FSHD1 [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5:1997-2003.
- [25] van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJ, Bakker E, van der Wielen MJ, Sandkuijl L, Hewitt JE, Padberg GW, Frants RR. A new dosage test for subtelomeric 4;10 translocations improves conventional diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) [J]. *J Med Genet*, 1999, 36:823-828.
- [26] Lemmers RJ, Van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75:44-53.
- [27] Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere [J]. *Nat Genet*, 2002, 32:235-236.
- [28] van Geel M, Dickson MC, Beck AF, Bolland DJ, Frants RR, van der Maarel SM, de Jong PJ, Hewitt JE. Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin [J]. *Genomics*, 2002, 79:210-217.
- [29] Lemmers RJ, van der Vliet PJ, van der Gaag KJ, Zuniga S, Frants RR, de Knijff P, van der Maarel SM. Worldwide population analysis of the 4q and 10q subtelomeres identifies only four discrete interchromosomal sequence transfers in human evolution [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86:364-377.
- [30] Lemmers RJ, Wohlgenuth M, van der Gaag KJ, van der Vliet PJ, van Teijlingen CM, de Knijff P, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81:884-894.
- [31] van der Maarel SM, Deidda G, Lemmers RJ, van Overveld PG, van der Wielen M, Hewitt JE, Sandkuijl L, Bakker B, van Ommen GJ, Padberg GW, Frants RR. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex - dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66:26-35.
- [32] Nguyen K, Walrafen P, Bernard R, Attarian S, Chaix C, Vovan C, Renard E, Dufrane N, Pouget J, Vannier A, Bensimon A, Lévy N. Molecular combing reveals allelic combinations in facioscapulohumeral dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 2011, 70:627-633.
- [33] Nguyen K, Puppo F, Roche S, Gaillard MC, Chaix C, Lagarde A, Pierret M, Vovan C, Olschwang S, Salort - Campana E, Attarian S, Bartoli M, Bernard R, Magdinier F, Levy N. Molecular combing reveals complex 4q35 rearrangements in facioscapulohumeral dystrophy [J]. *Hum Mutat*, 2017, 38:1432-1441.
- [34] Zhou YH, Xu YM, He WX, Hong F, Zhang W, Liu YQ, Zhu WH, Zhang C. The molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy based on single-molecular fluorescence in situ hybridization [J]. *Zhongguo Lin Chuang Shen Jing Ke Xue*, 2018, 26:269-280. [周运鹤, 许艺明, 何玮璇, 洪奋, 张巍, 刘逸奇, 朱雯华, 张成. 单分子荧光原位杂交技术在面肩胛型肌营养不良症精准诊断中的应用研究 [J]. *中国临床神经科学*, 2018, 26:269-280.]
- [35] Vasale J, Boyar F, Jocson M, Sulcova V, Chan P, Liaquat K, Hoffman C, Meservey M, Chang I, Tsao D, Hensley K, Liu Y, Owen R, Braastad C, Sun W, Walrafen P, Komatsu J, Wang JC, Bensimon A, Anguiano A, Jaremko M, Wang Z, Batish S, Strom C, Higgins J. Molecular combing compared to Southern blot for measuring D4Z4 contractions in FSHD [J]. *Neuromuscul Disord*, 2015, 25:945-951.
- [36] Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. Homeodomain proteins [J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63:487-526.
- [37] Gabriëls J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, Belayew A. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element [J]. *Gene*, 1999, 236: 25-32.
- [38] Clapp J, Mitchell LM, Bolland DJ, Fantes J, Corcoran AE,

- Scotting PJ, Armour JA, Hewitt JE. Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81:264-279.
- [39] Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Mattéotti C, Arias C, Corona ED, Nuñez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Rosa AL. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a proapoptotic protein[J]. *Neuromuscul Disord*, 2007, 17:611-623.
- [40] Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:18157-18162.
- [41] Snider L, Asawaicharn A, Tyler AE, Geng LN, Petek LM, Maves L, Miller DG, Lemmers RJ, Winokur ST, Tawil R, van der Maarel SM, Filippova GN, Tapscott SJ. RNA transcripts, miRNA - sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: 2414-2430.
- [42] Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camaño P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R, Frants RR, van der Maarel SM. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Science*, 2010, 329:1650-1653.
- [43] Snider L, Geng LN, Lemmers RJ, Kyba M, Ware CB, Nelson AM, Tawil R, Filippova GN, van der Maarel SM, Tapscott SJ, Miller DG. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6: E1001181.
- [44] Jones TI, Chen JC, Rahimov F, Homma S, Arashiro P, Beermann ML, King OD, Miller JB, Kunkel LM, Emerson CP, Wagner KR, Jones PL. Facioscapulohumeral muscular dystrophy family studies of DUX4 expression: evidence for disease modifiers and a quantitative model of pathogenesis[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21:4419-4430.
- [45] Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Vanderplanck C, Barro M, Charron S, Anseau E, Chen YW, Mercier J, Coppée F, Belayew A. DUX4 expression in FSHD muscle cells: how could such a rare protein cause a myopathy [J]? *J Cell Mol Med*, 2013, 17:76-89.
- [46] DeSimone AM, Pakula A, Lek A, Emerson CP Jr. Facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Compr Physiol*, 2017, 7:1229-1279.
- [47] Bosnakovski D, Xu Z, Gang EJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppée F, Belayew A, Perlingeiro RR, Kyba M. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies[J]. *EMBO J*, 2008, 27:2766-2779.
- [48] Mitsushashi H, Mitsushashi S, Lynn - Jones T, Kawahara G, Kunkel LM. Expression of DUX4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22:568-577.
- [49] Jones TI, Parilla M, Jones PL. Transgenic *Drosophila* for investigating DUX4 and FRG1, two genes associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) [J]. *PLoS One*, 2016, 11:E0150938.
- [50] Dandapat A, Perrin BJ, Cabelka C, Razzoli M, Ervasti JM, Bartolomucci A, Lowe DA, Kyba M. High frequency hearing loss and hyperactivity in DUX4 transgenic mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11:E0151467.
- [51] Statland JM, Odrzywolski KJ, Shah B, Henderson D, Fricke AF, van der Maarel SM, Tapscott SJ, Tawil R. Immunohistochemical characterization of facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle biopsies [J]. *J Neuromuscul Dis*, 2015, 2:291-299.
- [52] Block GJ, Narayanan D, Amell AM, Petek LM, Davidson KC, Bird TD, Tawil R, Moon RT, Miller DG. Wnt/ $\beta$  - catenin signaling suppresses DUX4 expression and prevents apoptosis of FSHD muscle cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22:4661-4672.
- [53] Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo [J]. *Ann Neurol*, 2011, 69:540-552.
- [54] Xu H, Wang Z, Jin S, Hao H, Zheng L, Zhou B, Zhang W, Lv H, Yuan Y. Dux4 induces cell cycle arrest at G1 phase through upregulation of p21 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446:235-240.
- [55] Vanderplanck C, Anseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Wilton SD, Coppée F, Belayew A. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by dux4 expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6:E26820.
- [56] Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy [J]. *Dev Cell*, 2012, 22:38-51.
- [57] Banerji CR, Knopp P, Moyle LA, Severini S, Orrell RW, Teschendorff AE, Zammit PS.  $\beta$ -Catenin is central to DUX4-driven network rewiring in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *J R Soc Interface*, 2015, 12:20140797.
- [58] Knopp P, Krom YD, Banerji CR, Panamarova M, Moyle LA, den Hamer B, van der Maarel SM, Zammit PS. DUX4 induces a transcriptome more characteristic of a less-differentiated cell state and inhibits myogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129:3816-3831.
- [59] Yao Z, Snider L, Balog J, Lemmers RJ, Van Der Maarel SM, Tawil R, Tapscott SJ. DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23:5342-5352.
- [60] Jagannathan S, Shadle SC, Resnick R, Snider L, Tawil RN, van der Maarel SM, Bradley RK, Tapscott SJ. Model systems of DUX4 expression recapitulate the transcriptional profile of FSHD cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25:4419-4431.
- [61] Krom YD, Thijssen PE, Young JM, den Hamer B, Balog J, Yao Z, Maves L, Snider L, Knopp P, Zammit PS, Rijkers T, van Engelen BG, Padberg GW, Frants RR, Tawil R, Tapscott SJ, van der Maarel SM. Intrinsic epigenetic regulation of the D4Z4 macrosatellite repeat in a transgenic mouse model for FSHD [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9:E1003415.
- [62] Dandapat A, Bosnakovski D, Hartweck LM, Arpke RW, Baltgalvis KA, Vang D, Baik J, Darabi R, Perlingeiro R, Hamra FK, Gupta K, Lowe DA, Kyba M. Dominant lethal pathologies in male mice engineered to contain an X-linked DUX4 transgene [J]. *Cell Rep*, 2014, 8:1484-1496.
- [63] Winokur ST, Bengtsson U, Feddersen J, Mathews KD, Weiffenbach B, Bailey H, Markovich RP, Murray JC, Wasmuth JJ, Altherr MR. The DNA rearrangement associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy involves a heterochromatin-associated repetitive element: implications for a role of chromatin structure in the pathogenesis of the disease

- [J]. *Chromosome Res*, 1994, 2:225-234.
- [64] van Deutekom JC, Lemmers RJ, Grewal PK, van Geel M, Romberg S, Dauwerse HG, Wright TJ, Padberg GW, Hofker MH, Hewitt JE, Frants RR. Identification of the first gene (FRG1) from the FSHD region on human chromosome 4q35 [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5:581-590.
- [65] Hanel ML, Wuebbles RD, Jones PL. Muscular dystrophy candidate gene FRG1 is critical for muscle development [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238:1502-1512.
- [66] Liu Q, Jones TL, Tang VW, Briehner WM, Jones PL. Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1 (FRG-1) is an actin-bundling protein associated with muscle-attachment sites [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 7):1116-1123.
- [67] Bodega B, Ramirez GD, Grasser F, Cheli S, Brunelli S, Mora M, Meneveri R, Marozzi A, Mueller S, Battaglioli E, Ginelli E. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation [J]. *BMC Biol*, 2009, 7:41.
- [68] Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle [J]. *Cell*, 2002, 110:339-348.
- [69] Homma S, Chen JC, Rahimov F, Beermann ML, Hanger K, Bibat GM, Wagner KR, Kunkel LM, Emerson CP Jr, Miller JB. A unique library of myogenic cells from facioscapulohumeral muscular dystrophy subjects and unaffected relatives: family, disease and cell function [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20:404-410.
- [70] Krom YD, Dumonceaux J, Mamchaoui K, den Hamer B, Mariot V, Negroni E, Geng LN, Martin N, Tawil R, Tapscott SJ, van Engelen BG, Mouly V, Butler-Browne GS, van der Maarel SM. Generation of isogenic D4Z4 contracted and noncontracted immortal muscle cell clones from a mosaic patient: a cellular model for FSHD [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181:1387-1401.
- [71] Gabellini D, D'Antona G, Moggio M, Prella A, Zecca C, Adami R, Angeletti B, Ciscato P, Pellegrino MA, Bottinelli R, Green MR, Tupler R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1 [J]. *Nature*, 2006, 439:973-977.
- [72] D'Antona G, Brocca L, Pansarasa O, Rinaldi C, Tupler R, Bottinelli R. Structural and functional alterations of muscle fibres in the novel mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *J Physiol*, 2007, 584(Pt 3):997-1009.
- [73] Pistoni M, Shiue L, Cline MS, Bortolanza S, Neguembor MV, Xynos A, Ares M Jr, Gabellini D. Rbfox1 downregulation and altered calpain 3 splicing by FRG1 in a mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9:E1003186.
- [74] Xynos A, Neguembor MV, Caccia R, Licastro D, Nonis A, Di Serio C, Stupka E, Gabellini D. Overexpression of facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene 1 causes primary defects in myogenic stem cells [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 10):2236-2245.
- [75] Sancisi V, Germinario E, Esposito A, Morini E, Peron S, Moggio M, Tomelleri G, Danieli-Betto D, Tupler R. Altered Tnnt3 characterizes selective weakness of fast fibers in mice overexpressing FSHD region gene 1 (FRG1) [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2014, 306:R124-137.
- [76] Neguembor MV, Xynos A, Onorati MC, Caccia R, Bortolanza S, Godio C, Pistoni M, Corona DF, Schotta G, Gabellini D. FSHD muscular dystrophy region gene 1 binds Suv4-20h1 histone methyltransferase and impairs myogenesis [J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5:294-307.
- [77] Katoh M. Function and cancer genomics of FAT family genes [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41:1913-1918.
- [78] Caruso N, Herberth Bz, Bartoli M, Puppo F, Dumonceaux J, Zimmermann A, Denadai S, Lebossé M, Roche S, Geng L, Magdinier F, Attarian S, Bernard R, Maina F, Levy N, Helmbacher F. Deregulation of the protocadherin gene FAT1 alters muscle shapes: implications for the pathogenesis of facioscapulohumeral dystrophy [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9: E1003550.
- [79] Puppo F, Dionnet E, Gaillard MC, Gaidrat P, Castro C, Vovan C, Bertaux K, Bernard R, Attarian S, Goto K, Nishino I, Hayashi Y, Magdinier F, Krahn M, Helmbacher F, Bartoli M, Lévy N. Identification of variants in the 4q35 gene FAT1 in patients with a facioscapulohumeral dystrophy-like phenotype [J]. *Hum Mutat*, 2015, 36:443-453.
- [80] Mariot V, Roche S, Houdé C, Portillo D, Sacconi S, Puppo F, Duguez S, Rameau P, Caruso N, Delezoide AL, Desnuelle C, Bessières B, Collardeau S, Feasson L, Maisonneuve T, Magdinier F, Helmbacher F, Butler-Browne G, Mouly V, Dumonceaux J. Correlation between low FAT1 expression and early affected muscle in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 2015, 78: 387-400.
- [81] Park HJ, Lee W, Kim SH, Lee JH, Shin HY, Kim SM, Park KD, Lee JH, Choi YC. FAT1 gene alteration in facioscapulohumeral muscular dystrophy type 1 [J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59:337-340.
- [82] Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications [J]. *CMAJ*, 2006, 174:341-348.
- [83] Zeng W, de Greef JC, Chen YY, Chien R, Kong X, Gregson HC, Winokur ST, Pyle A, Robertson KD, Schmiesing JA, Kimonis VE, Balog J, Frants RR, Ball AR Jr, Lock LF, Donovan PJ, van der Maarel SM, Yokomori K. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5:E1000559.
- [84] Altherr MR, Bengtsson U, Markovich RP, Winokur ST. Efforts toward understanding the molecular basis of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Muscle Nerve*, 1995, 18:S32-38.
- [85] Cabianca Daphne S, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, Gabellini D. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy [J]. *Cell*, 2012, 149:819-831.
- [86] Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16:519-532.
- [87] van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen G, Frants RR, van der Maarel SM. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Nat Genet*, 2003, 35:315-317.
- [88] van Overveld PG, Enthoven L, Ricci E, Rossi M, Felicetti L, Jeanpierre M, Winokur ST, Frants RR, Padberg GW, van der Maarel SM. Variable hypomethylation of D4Z4 in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 2005, 58:569-576.
- [89] Gaillard MC, Roche S, Dion C, Tasmadjian A, Bouget G, Salort-Campana E, Vovan C, Chaix C, Brouqsault N, Morere J, Puppo F, Bartoli M, Levy N, Bernard R, Attarian S, Nguyen K, Magdinier F. Differential DNA methylation of the D4Z4 repeat in patients with FSHD and asymptomatic carriers [J]. *Neurology*,



- 2014, 83:733-742.
- [90] Lemmers RJ, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, Camano P, Ramos Arroyo MA, Jerico I, Rogers MT, Miller DG, Upadhyaya M, Verschuuren JJ, Lopez de Munain Arregui A, van Engelen BG, Padberg GW, Sacconi S, Tawil R, Tapscott SJ, Bakker B, van der Maarel SM. Interindividual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2 [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24:659-669.
- [91] Huichalaf C, Micheloni S, Ferri G, Caccia R, Gabellini D. DNA methylation analysis of the macrosatellite repeat associated with FSHD muscular dystrophy at single nucleotide level [J]. *PLoS One*, 2015, 9:E115278.
- [92] Jones TI, Yan C, Sapp PC, McKenna - Yasek D, Kang PB, Quinn C, Salameh JS, King OD, Jones PL. Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing [J]. *Clin Epigenetics*, 2014, 6:23.
- [93] Jones TI, King OD, Himeda CL, Homma S, Chen JCJ, Beermann ML, Yan C, Emerson CP, Miller JB, Wagner KR, Jones PL. Individual epigenetic status of the pathogenic D4Z4 macrosatellite correlates with disease in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7:37.
- [94] de Greef JC, Lemmers RJ, van Engelen BG, Sacconi S, Venance SL, Frants RR, Tawil R, van der Maarel SM. Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30: 1449-1459.
- [95] de Greef JC, Lemmers RJ, Camaño P, Day JW, Sacconi S, Dunand M, van Engelen BG, Kiuru - Enari S, Padberg GW, Rosa AL, Desnuelle C, Spuler S, Tarnopolsky M, Venance SL, Frants RR, van der Maarel SM, Tawil R. Clinical features of facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 [J]. *Neurology*, 2010, 75:1548-1554.
- [96] Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, Sun Y, den Dunnen JT, Helmer Q, Donlin-Smith CM, Padberg GW, van Engelen BG, de Greef JC, Aartsma - Rus AM, Frants RR, de Visser M, Desnuelle C, Sacconi S, Filippova GN, Bakker B, Bamshad MJ, Tapscott SJ, Miller DG, van der Maarel SM. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD - permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 [J]. *Nat Genet*, 2012, 44:1370-1374.
- [97] Calandra P, Cascino I, Lemmers RJ, Galluzzi G, Teveroni E, Monforte M, Tasca G, Ricci E, Moretti F, van der Maarel SM, Deidda G. Allele-specific DNA hypomethylation characterises FSHD1 and FSHD2 [J]. *J Med Genet*, 2016, 53:348-355.
- [98] de Greef JC, Wohlgemuth M, Chan OA, Hansson KB, Smeets D, Frants RR, Weemaes CM, Padberg GW, van der Maarel SM. Hypomethylation is restricted to the D4Z4 repeat array in phenotypic FSHD [J]. *Neurology*, 2007, 69:1018-1026.
- [99] Winston J, Duerden L, Mort M, Frayling IM, Rogers MT, Upadhyaya M. Identification of two novel SMCHD1 sequence variants in families with FSHD-like muscular dystrophy [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23:67-71.
- [100] van den Boogaard ML, Lemmers RJ, Balog J, Wohlgemuth M, Auranen M, Mitsuhashi S, van der Vliet PJ, Straasheijm KR, van den Akker RF, Kriek M, Laurence - Bik EY, Raz V, van Ostaijen - ten Dam MM, Hansson BM, vander Kooi EL, Kiuru - Enari S, Udd B, van Tol Maarten JD, Nishino I, Tawil R, Tapscott SJ, van Engelen Baziel GM, van der Maarel SM. Mutations in DNMT3B modify epigenetic repression of the D4Z4 repeat and the penetrance of facioscapulohumeral dystrophy [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98:1020-1029.
- [101] Tawil R, McDermott MP, Pandya S, King W, Kissel J, Mendell JR, Griggs RC. A pilot trial of prednisone in facioscapulohumeral muscular dystrophy: FSH - DY Group [J]. *Neurology*, 1997, 48:46-49.
- [102] Elsheikh BH, Bollman E, Peruggia M, King W, Galloway G, Kissel JT. Pilot trial of diltiazem in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Neurology*, 2007, 68:1428-1429.
- [103] Kissel JT, McDermott MP, Mendell JR, King WM, Pandya S, Griggs RC, Tawil R; FSH - DY Group. Randomized, double-blind, placebo - controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy [J]. *Neurology*, 2001, 57:1434-1440.
- [104] van der Kooi EL, Vogels OJ, van Asseldonk RJ, Lindeman E, Hendriks JC, Wohlgemuth M, van der Maarel SM, Padberg GW. Strength training and albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Neurology*, 2004, 63:702-708.
- [105] Passerieux E, Hayot M, Jaussent A, Carnac G, Gouzi F, Pillard F, Picot MC, Böcker K, Hugon G, Pincemail J, Defraigne JO, Verrips T, Mercier J, Laoudj-Chenivresse D. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double - blind randomized controlled clinical trial [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 81:158-169.
- [106] Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, Flanigan KM, Pestronk A, Tawil R, Wolfe GI, Eagle M, Florence JM, King WM, Pandya S, Straub V, Juneau P, Meyers K, Csimma C, Araujo T, Allen R, Parsons SA, Wozney JM, Lavallie ER, Mendell JR. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy [J]. *Ann Neurol*, 2008, 63:561-571.
- [107] Lim JW, Snider L, Yao Z, Tawil R, Van Der Maarel SM, Rigo F, Bennett CF, Filippova GN, Tapscott SJ. DICER/AGO - dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24:4817-4828.
- [108] Wallace LM, Liu J, Domire JS, Garwick - Coppens SE, Guckes SM, Mendell JR, Flanigan KM, Harper SQ. RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity in vivo: Implications for a targeted FSHD therapy [J]. *Mol Ther*, 2012, 20:1417-1423.
- [109] Marsollier AC, Ciszewski L, Mariot V, Popplewell L, Voit T, Dickson G, Dumonceaux J. Antisense targeting of 3' end elements involved in DUX4 mRNA processing is an efficient therapeutic strategy for facioscapulohumeral dystrophy: a new gene-silencing approach [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25:1468-1478.
- [110] Chen JC, King OD, Zhang Y, Clayton NP, Spencer C, Wentworth BM, Emerson CP Jr, Wagner KR. Morpholino-mediated knockdown of DUX4 toward facioscapulohumeral muscular dystrophy therapeutics [J]. *Mol Ther*, 2016, 24:1405-1411.
- [111] Marsollier AC, Joubert R, Mariot V, Dumonceaux J. Targeting the polyadenylation signal of pre-mRNA: a new gene silencing approach for facioscapulohumeral dystrophy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19:E1347.
- [112] Himeda CL, Jones TI, Jones PL. CRISPR/dCas9 - mediated transcriptional inhibition ameliorates the epigenetic dysregulation at D4Z4 and represses DUX4 - fl in FSH muscular dystrophy [J]. *Mol Ther*, 2016, 24:527-535.
- [113] Bortolanza S, Nonis A, Sanvito F, Maciotta S, Sitia G, Wei J,

- Torrente Y, Di Serio C, Chamberlain JR, Gabellini D. AAV6-mediated systemic shRNA delivery reverses disease in a mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Mol Ther*, 2011, 19:2055-2064.
- [114] Wallace LM, Garwick - Coppens SE, Tupler R, Harper SQ. RNA interference improves myopathic phenotypes in mice overexpressing FSHD region gene 1 (FRG1) [J]. *Mol Ther*, 2011, 19:2048-2054.
- [115] Feeney SJ, McGrath MJ, Sriratana A, Gehrig SM, Lynch GS, D'Arcy CE, Price JT, McLean CA, Tupler R, Mitchell CA. FHL1 reduces dystrophy in transgenic mice overexpressing FSHD muscular dystrophy region gene 1 (FRG1) [J]. *PLoS One*, 2015, 10:E0117665.
- [116] Tan MX. A review of the literature on the study of progressive muscular dystrophy and a report on the clinical analysis of 33 cases [J]. *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi*, 1955, 1:29-41. [谭铭勋. 进行性肌营养不良症温习文献并报告三十三例之临床分析 [J]. *中华神经精神科杂志*, 1955, 1:29-41.]
- [117] Xu WZ, Mou SH, Dong YH, Yao XY. A family study of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Zhongguo Shen Jing Jing Shen Ji Bing Za Zhi*, 1983, 9:12-14. [徐文楨, 牟庶华, 东云华, 姚先莹. 面-肩-肱型进行性肌营养不良症的一个家系研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1983, 9:12-14.]
- [118] Zeng Y, Zhang C, Su QX. Gene diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2001, 18:213-215. [曾纛, 张成, 苏全喜. 面肩肱型肌营养不良症的基因诊断 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 18:213-215.]
- [119] Matsumura T, Goto K, Yamanaka G, Lee JH, Zhang C, Hayashi YK, Arahata K. Chromosome 4q;10q translocations: comparison with different ethnic populations and FSHD patients [J]. *BMC Neurol*, 2002, 20:7.
- [120] Su QX, Zhang C, Zeng Y, Lu XL, Liu XR, Wang ZH, Zhu YZ. Study on chromosome 4q35 and 10q26 translocation of facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2003, 25:196. [苏全喜, 张成, 曾纛, 卢锡林, 刘晓蓉, 王展航, 朱燕珍. 面肩肱型肌营养不良症染色体 4q35 和 10q26 易位的研究 [J]. *中国医学科学院学报*, 2003, 25:196.]
- [121] Wang N, Wu ZY, Wang CD, Wang ZQ, Lin MT, Fang L, Murong SX. Mechanism of translocation between chromosomes 4q and 10q in facioscapulohumeral muscular dystrophy [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003, 83:650-652. [王柠, 吴志英, 王朝东, 王志强, 林珉婷, 方玲, 慕容慎行. 面肩肱型肌营养不良症患者染色体 4q-10q 相互易位机制的初步研究 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83:650-652.]
- [122] Wang ZQ, Wu ZY, Wang N, Lin MT, Murong SX. Study on characteristics of gene structure and gene diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy using pulse field gel electrophoresis [J]. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2004, 37:521-525. [王志强, 吴志英, 王柠, 林珉婷, 慕容慎行. 应用脉冲场电泳技术研究面肩肱型肌营养不良症的基因突变特征及进行基因诊断 [J]. *中华神经科杂志*, 2004, 37:521-525.]
- [123] Chen ZJ. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in Chinese population characteristics of alleles 4qA/4qB in 4q subtelomere [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2006. [陈中杰. 中国人面肩肱型肌营养不良症亚端粒区 4qA/4qB 等位基因结构特征的研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2006.]
- [124] Li WY. Genetic diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by real-time fluorescent quantitative PCR [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2007. [李婉仪. 面肩肱型肌营养不良症 (FSHD) 实时荧光定量 PCR 诊断方法的研究 [D]. 广州: 中山大学, 2007.]
- [125] Su QX, Li WY, Zhang C, Xiong F, Shen BC, Hong MF, Lu XL. Genetic diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. *Zhonghua Shen Jing Ke Za Zhi*, 2009, 42:555-557. [苏全喜, 李婉仪, 张成, 熊符, 申本昌, 洪铭范, 卢锡林. 实时荧光定量聚合酶链反应诊断面肩肱型肌营养不良 [J]. *中华神经科杂志*, 2009, 42:555-557.]
- [126] Su QX, Li WY, Zhang C, Xiong F, Hong MF, Liu AQ, Tian SJ. Factors influencing diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *Jun Yi Jin Xiu Xue Yuan Xue Bao*, 2011, 32:748-751. [苏全喜, 李婉仪, 张成, 熊符, 洪铭范, 刘爱群, 田素娟. 面肩肱型肌营养不良实时荧光定量 PCR 诊断方法的影响因素分析 [J]. *军医进修学院学报*, 2011, 32:748-751.]

(收稿日期: 2019-05-14)

**下期内容预告** 本刊 2019 年第 6 期报道专题为神经系统遗传性疾病, 重点内容包括: 重视神经肌肉病的临床遗传咨询; 脊髓性肌萎缩症治疗临床研究进展; 重型糖原贮积病 II 型呼吸机撤机困难的对策; 僵人综合征 11 例临床及电生理学特点分析; 误诊为慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病的正己烷中毒性周围神经病两例临床分析; 晚发型甲基丙二酸尿症 cblC 型家系快速诊断、治疗与随访; 遗传性痉挛性共济失调 2 型一家系临床表型与基因突变分析; *SOD1<sup>A4V</sup>* 基因突变致家族性肌萎缩侧索硬化症伴腓肠肌水肿一例临床表型及基因突变分析