

· 标准与规范 ·

抗肌萎缩蛋白病中国诊断指南

中华医学会罕见病分会 北京医学会罕见病分会

通信作者:熊晖,北京大学第一医院儿科,北京 100034,Email:xh_bjbj@163.com;袁云,北京大学第一医院神经内科,北京 100034,Email:yuanyun2002@126.com

【摘要】 抗肌萎缩蛋白病是由编码抗肌萎缩蛋白的DMD基因致病性变异所导致的一组主要累及骨骼肌和(或)心机的X-连锁隐性遗传性肌病,包括Duchenne型肌营养不良、Becker型肌营养不良以及X-连锁扩张型心肌病。DMD基因致病性变异广泛而复杂,导致部分患者的诊断和临床分型复杂而困难。精准的分子遗传学诊断对于抗肌萎缩蛋白病的临床诊治、多学科管理、遗传咨询、产前诊断和基因治疗的选择具有重要意义。本指南基于抗肌萎缩病的研究进展,借鉴国内外抗肌萎缩蛋白病的指南共识,在抗肌萎缩蛋白病的临床表现、遗传学基础、诊断及临床分型、遗传学诊断流程以及临床遗传咨询方面达成共识,提出18条推荐意见。本指南旨在规范和优化抗肌萎缩蛋白病的诊断,为临床医师和政府管理人员的工作提供参考,共同降低抗肌萎缩蛋白病患者的诊断难度。

【关键词】 肌营养不良; 抗肌萎缩蛋白; 诊断; 指南

基金项目:国家自然科学基金(82201553);中央高水平医院临床科研业务费资助(北京大学第一医院高质量临床研究专项;2023HQ10)

Chinese guidelines on the diagnosis of dystrophinopathy*Chinese Medical Association Rare Disease Branch, Beijing Medical Association Rare Disease Branch**Corresponding authors: Xiong Hui, Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China, Email: xh_bjbj@163.com; Yuan Yun, Department of Neurology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China, Email: yuanyun2002@126.com*

【Abstract】 Dystrophinopathy refers to a group of X-linked recessive myopathies that primarily affect skeletal and/or cardiac muscle caused by pathogenic variants in the dystrophin-encoding DMD gene, including Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, and X-linked dilated cardiomyopathy. The broad and complex spectrum of pathogenic DMD variants complicates the diagnosis and clinical classification in some patients. The precise genetic diagnosis is of great significance for the clinical diagnosis and treatment, multidisciplinary management, genetic counseling, prenatal diagnosis, and selection of gene therapy in dystrophinopathy. The present guideline is primarily based on the research advances in dystrophinopathy. Meanwhile, the foreign and domestic clinical guidelines or consensus for dystrophinopathy were referenced to put forward 18 recommendations and reach a consensus on the clinical manifestations, genetic basis, clinical diagnosis and classification, genetic diagnosis, and clinical genetic counseling of dystrophinopathy. This guideline aims to standardize and optimize the diagnostic process and reduce the diagnostic difficulty of patients with dystrophinopathy. In addition, this guideline provides some practical reference for clinicians and government staff.

【Key words】 Muscular dystrophy; Dystrophin; Diagnosis; Guideline

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82201553); National High Level Hospital Clinical Research Funding (High Quality Clinical Research Project of Peking University First

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20231217-01402

收稿日期 2023-12-17 本文编辑 朱瑶

引用本文:中华医学会罕见病分会,北京医学会罕见病分会.抗肌萎缩蛋白病中国诊断指南[J].中华医学杂志,2024,104(11):822-833. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20231217-01402.

中华医学杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



Hospital; 2023HQ10)

抗肌萎缩蛋白病(dystrophinopathy)是由位于 Xp21.2 的抗肌萎缩蛋白基因(dystrophin, DMD)致病性变异所导致的一组主要累及骨骼肌和(或)心肌的 X-连锁隐性遗传性肌病^[1-2],以男性患者为主,少数女性 DMD 基因致病性变异携带者也可出现不同程度的骨骼肌和(或)心肌受累。DMD 基因的完全或部分失功能变异引起多种抗肌萎缩蛋白同源异构体出现质和(或)量的异常,其中 Dp427m 异构体的缺陷导致患者出现骨骼肌和(或)心肌的受累,形成抗肌萎缩蛋白病的典型表型谱系^[2],包括 Duchenne 型肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、Becker 型肌营养不良(Becker muscular dystrophy, BMD)、X-连锁扩张型心肌病(X-linked dilated cardiomyopathy, XLDCM)。作为最常见的遗传性肌病,DMD 和 BMD 的发病率在存活男婴中分别约为 19.8/100 000^[3]和 5.4/100 000^[4],DMD 和 BMD 的人群患病率分别约为 4.8/100 000 和 1.6/100 000^[5],XLDCM 和女性抗肌萎缩蛋白病的流行病学情况尚不明确。

中国抗肌萎缩蛋白病患者的就医困难主要包括诊断分型困难以及相关医疗费用的报销困难。因 DMD 基因结构的高度复杂性,其致病性变异广泛而复杂^[6-12],导致抗肌萎缩蛋白病的遗传学诊断在部分患者中相对复杂而困难。精准的分子遗传学诊断对于抗肌萎缩蛋白病的临床诊治、多学科管理、遗传咨询、产前诊断和基因治疗的选择具有重要意义。本指南旨在规范和优化抗肌萎缩蛋白病的诊断,为临床医师和政府管理人员的工作提供参考,共同降低抗肌萎缩蛋白病患者的诊断难度。

一、指南制订方法

本指南借鉴国内外近年抗肌萎缩蛋白病的指南共识^[13-16],同时对国内外文献进行综合分析,以抗肌萎缩蛋白病专家讨论会的方式完成。本指南主要由具有医学遗传学和临床实践经验的多学科专家研究制订,多学科专家小组包括两个小组,分三个阶段对指南内容进行了撰写和修改,采取专家讨论会的方法进行讨论和验证。

第一阶段,委托神经内科专家起草指南的初稿,神经内科专家通过北京大学医学图书馆网站对电子数据库 NCBI PubMed、中国知网、万方数据库的文献进行检索,检索时间为 1970 年 1 月至

2023 年 11 月。采用布尔逻辑检索技术,检索表达式为“A and B”,其中 A 的主要检索词包括 dystrophin、DMD、dystrophinopathies、Duchenne muscular dystrophy、Becker muscular dystrophy、X-linked dilated cardiomyopathy、抗肌萎缩蛋白病、假肥大型肌营养不良,B 的主要检索词包括 diagnosis、genetic diagnosis、molecular diagnosis、guideline、诊断、遗传学诊断、指南。

第二阶段,成立指南核心工作小组,由来自神经病学、儿科学和医学遗传学领域的专家组成,核心工作小组成员对指南初稿进行讨论、修改和确认,满足基层医师的工作需要以及医保政策的需要。

第三阶段,建立指南完善小组,专家组成员来自神经内科、儿科、生殖医学、卫生经济学领域以及基因检测实验室人员,对核心工作小组确认的指南进行评议、修改和确认,满足分级诊疗的需要,使相关检查符合国家医保的要求。本指南由不同领域的 26 位专家对每一条推荐意见进行投票,对有争议的推荐意见进行多次讨论后确定最终的推荐意见。

核心工作小组在中华医学会罕见病分会和北京医学会罕见病分会的领导下确认并发布该指南。所有参与的专家组成员声明无利益冲突,也无利益相关企业的参与。本指南的制订由中央高水平医院临床研究专项和国家自然科学基金联合资助。

二、临床表现

(一)男性患者

1. DMD: 根据 DMD 患者肢体无力的表现以及伴随的其他器官系统损害,病情进展可分为 5 个阶段,分别是症状前期、早期独走期、晚期独走期、早期不能独走期以及晚期不能独走期^[13, 15]。症状前期主要表现为运动发育迟缓,可伴有不同程度的静止性认知障碍^[17-19]。患者通常在 5 岁前起病,多数在 2~4 岁便开始出现肢体无力的表现,随后进入早期独走期,表现为跑、跳功能明显差于同龄儿、上楼费力、蹲起费力、Gowers 征阳性,可出现“鸭步”、腰椎前凸以及踮脚尖走路^[20]。大部分患者的病情通常在 7 岁后开始加速进展^[21],进入晚期独走期,表现为不能完成 Gowers 征、不能跑、不能独立上楼梯、跟腱挛缩明显加重^[22]。患者通常在 13 岁前丧失独立行走能力^[23],进入早期不能独走期,此阶段



患者还可短距离辅助行走、独坐或辅助站立,部分患者开始出现肘关节的挛缩以及脊柱侧弯^[24],消化功能开始下降。当患者进入晚期不能独走期后,双上肢功能受限逐渐加重,开始出现心脏受损的表现和呼吸功能障碍,14岁之后约1/3患者会出现心肌病变,18岁之后几乎所有患者会出现心肌病变^[25-27],进行性的呼吸肌无力最终可导致患者出现呼吸衰竭,多数患者因心力衰竭或呼吸衰竭而在30岁以前死亡(中位数为19岁左右)^[28]。及时诊断、适度的糖皮质激素治疗以及其他器官系统损害的早期发现和治疗均可以延缓疾病发展^[13]。

2. BMD: BMD患者的临床表现具有高度异质性,包括经典的肢带型肌营养不良、股四头肌肌病、孤立性痉挛疼痛综合征、运动诱发的肌红蛋白尿以及无症状高肌酸激酶血症,病情进展相对缓慢,病程长短不一,可达数十年之久^[29-36]。患者可于5~50岁之间出现骨骼肌和(或)心肌受累的症状,在16岁后仍可独立行走,少数患者的独立行走能力可以持续到50~70岁^[12, 29-36]。BMD易出现扩张型心肌病并且是导致患者死亡的最常见原因,60%~70%的BMD患者存在不同程度的心脏受累^[25, 36-37]。当BMD患者骨骼肌受累不严重而出现严重的心肌病时,表型上与XLDCM存在一定的重叠,此类患者的骨骼肌受累较经典的XLDCM为重,患者可以出现轻度的肢体无力和萎缩,可于20~50岁之间出现扩张型心肌病^[36, 38-39]。

3. XLDCM: 典型的XLDCM患者通常在10~20岁之间起病,很快出现扩张型心肌病相关的充血性心力衰竭,常在诊断后的数年内因心力衰竭而死亡^[25, 40-41]。患者无骨骼肌受累的临床表现或骨骼肌受累很轻,多表现为高肌酸激酶血症、运动诱发的肌痛或肌痉挛以及腓肠肌肥大^[41-42]。

(二) 女性患者

大部分女性DMD基因致病性变异携带者无临床表现,2.5%~25.7%的女性DMD基因致病性变异携带者可出现不同程度的骨骼肌和(或)心肌受累,被称为女性抗肌萎缩蛋白病或症状性女性DMD基因致病性变异携带者^[43-47]。女性抗肌萎缩蛋白病患者亦可表现为DMD、BMD或XLDCM的表型,但以BMD的表型最为常见^[43, 47],其中XLDCM的起病多隐匿,常持续进展,最终可因失代偿性心力衰竭而死亡^[48]。

推荐意见 1: 儿童早期(5岁前)出现四肢近端无力、腓肠肌肥大和肌酸激酶显著升高,为DMD的

红旗征。

推荐意见 2: 儿童期(5岁后)出现四肢近端无力、股四头肌严重无力、腓肠肌肥大和肌酸激酶显著升高,为BMD的红旗征。

推荐意见 3: 青少年后出现进行性发展的扩张型心肌病,没有明显的肢体无力,肌酸激酶不同程度地升高,需考虑XLDCM的可能。

推荐意见 4: 不建议将BMD再分为经典的肢带型肌营养不良、股四头肌肌病和无症状高肌酸激酶血症。

推荐意见 5: 不建议将中间型抗肌萎缩蛋白病列为一个单独的临床亚型。

三、遗传学基础

(一) DMD基因及抗肌萎缩蛋白

DMD基因是位于Xp21.2的蛋白编码基因(NCBI RefSeqGene NG_012232.1),其全长超过了2.2 Mb,约占人类基因组全长的0.1%或X染色体的1.5%^[2, 49]。DMD基因全长的99%序列为内含子序列,86个外显子序列(包括7个与不同启动子相匹配的1号外显子)仅占1%左右^[2]。超长的序列长度和多个外显子结构使得DMD基因发生突变的概率远超过了其他单基因病的致病基因^[49]。在DMD基因的内含子序列中存在着丰富的散在重复元件和脆性位点^[50-53],使得DMD基因易于出现外显子缺失/重复变异以及结构变异^[49, 54-55]。

DMD基因的全长转录本约为14 kb,通过可变剪接形成不同长度的转录本,翻译的抗肌萎缩蛋白同源异构体包括3种全长异构体和4种截短异构体。本指南仅介绍由DMD基因全长转录本(NCBI RefSeq transcript NM_004006.2)编码的抗肌萎缩蛋白全长异构体Dp427m(NCBI RefSeq protein NP_003997.1),该异构体的异常形成抗肌萎缩蛋白病的典型表型谱系。Dp427m由四个主要的功能结构域组成,分别是氨基端(N端)的肌动蛋白结合区1、中央杆状区(R端)的24个血影蛋白样重复结构、半胱氨酸富集区以及羧基端(C端)结构域^[2]。中央杆状区的24个血影蛋白样重复结构占据了抗肌萎缩蛋白全长异构体的大部分区域,中央杆状区的两端及内部被4个铰链结构所连接,第11~17个血影蛋白样重复结构组成了抗肌萎缩蛋白的第2个肌动蛋白结合区^[56]。半胱氨酸富集区和C-端结构域还包含一些重要的亚单位结构域,分别是2个EF-hand结构域、ZZ结构域以及Leu七肽重复区。



(二)DMD 基因致病性

变异 DMD 基因的致病性变异可分为经典变异和非经典变异两大类,经典变异主要是涉及外显子区域和经典剪接位点的变异,非经典变异主要包括非经典剪接区域和深在内含子区域中的变异以及复杂结构变异等^[6-12, 14, 57-59]。经典变异占 DMD 基因致病性变异的 98.9%~99.7%,非经典变异占 1.1%~2.6%^[10, 12, 14]。

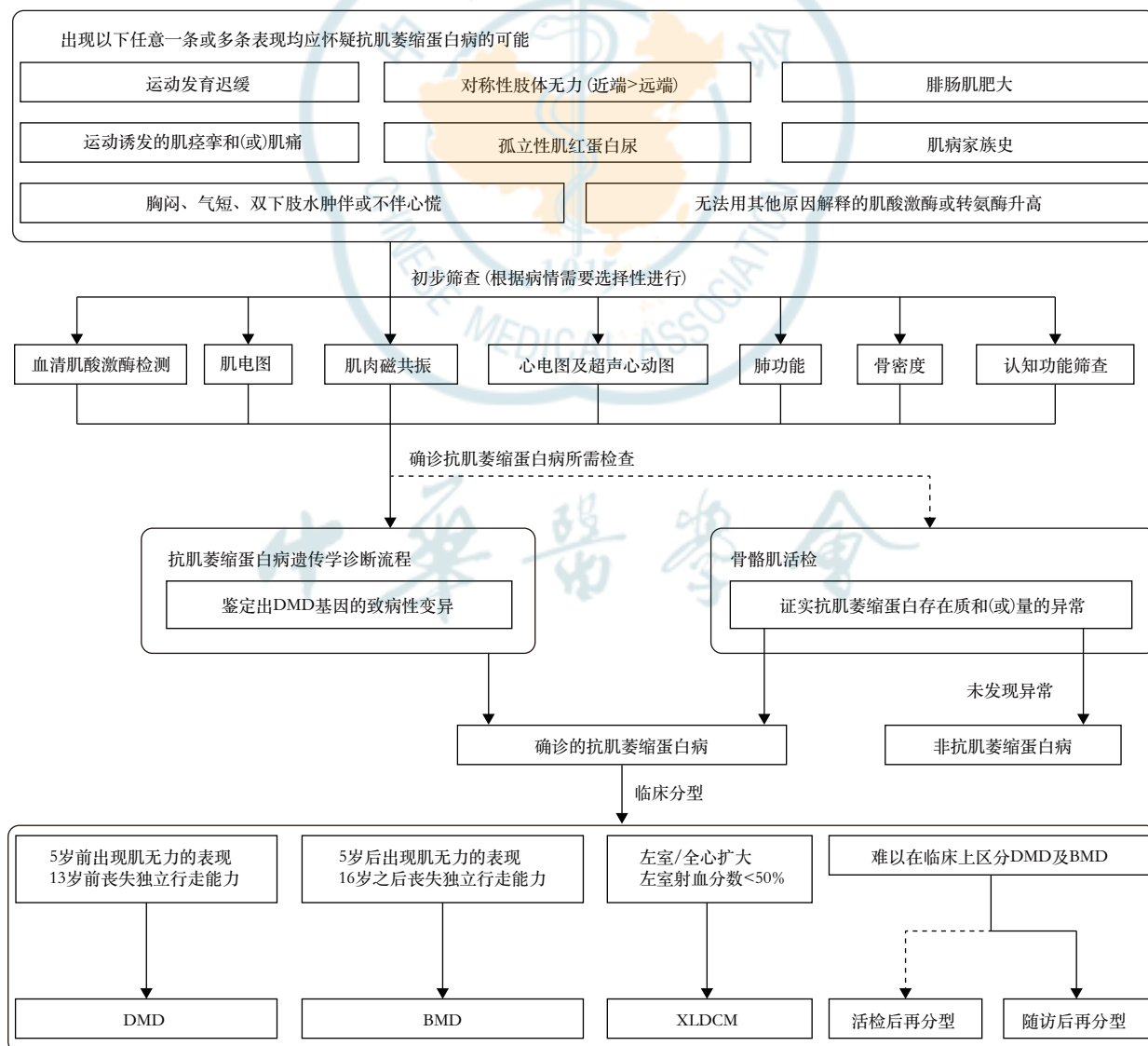
依据变异涉及的 DNA 长度与形式,分为单核苷酸变异、微小插入/缺失变异、外显子缺失/重复变异以及结构变异。单核苷酸变异为单个核苷酸的改变。微小插入/缺失变异通常<20 bp,包括微小插入变异、微小缺失变异以及微小缺失-插入变异,微小重复变异是微小插入变异的一种特殊类型。结构变

异包括大范围的插入、缺失、缺失-插入、倒位、易位等。外显子缺失/重复变异是 DMD 基因致病性变异中最常见的变异类型,约占 80%,其中缺失变异约占 70%,重复变异约占 10%^[6, 60-63]。微小致病性变异约占 DMD 基因致病性变异的 20%^[6, 60-61]。DMD 基因外显子缺失/重复变异的分布并不是随机的,主要集中在 DMD 基因的两个热点区域,分别是 45~55 号外显子区域和 2~20 号外显子区域^[6, 60-64]。

四、诊断及临床分型流程

(一)疑诊及初步筛查

当患者出现下列表现,应怀疑抗肌萎缩蛋白病的可能^[13, 15](图 1),包括(1)运动发育迟缓;(2)对称性肢体无力(近端>远端)、腓肠肌肥大;(3)运动诱发的肌痉挛和(或)肌痛;(4)胸闷、气短、双下肢水



注:DMD为Duchenne型肌营养不良;BMD为Becker型肌营养不良;XLDCM为X-连锁扩张型心肌病;虚线箭头表示如有可能应行的检查

图1 抗肌萎缩蛋白病的诊断及临床分型流程图^[15]



肿伴或不伴心慌;(5)孤立性肌红蛋白尿;(6)肌病家族史;(7)无法用其他原因解释的血清肌酸激酶或转氨酶升高。对于疑诊的患者,根据病情需要,选择性进行肌电图、肌肉磁共振、心电图、超声心动图、肺功能、骨密度、认知功能筛查检查,确定患者骨骼肌和其他器官系统的受累程度。

(二)确诊标准

抗肌萎缩蛋白病的确诊标准:(1)存在 DMD 基因的致病性变异;(2)骨骼肌病理学检查证实抗肌萎缩蛋白存在质和(或)量的异常,同时除外其他导致抗肌萎缩蛋白继发性表达缺陷的疾病。对于单纯心脏受累的患者,必要时可进行心肌病理学检查。对于临床疑诊的抗肌萎缩蛋白病患者,存在(1)和(或)(2)均可确诊为抗肌萎缩蛋白病。

(三)临床分型诊断

抗肌萎缩蛋白病的临床分型主要依据患者的临床表现进行(图 1),在未经治疗的情况下 5 岁前出现肢体无力以及 13 岁之前丧失独立行走能力的患者属于 DMD,5 岁后出现肢体无力以及 16 岁之后丧失独立行走能力的患者属于 BMD。在 13~16 岁之间丧失独立行走能力的患者,临床表现较经典 DMD 轻,但较经典的 BMD 患者重^[65],被视为中间型抗肌萎缩蛋白病,属于轻型 DMD。无骨骼肌受累的临床表现或骨骼肌受累很轻,但以扩张型心脏病为主要表现的患者属于 XLDCM。女性患者出现骨骼肌和(或)心肌受累时,属于症状性女性 DMD 基因致病性变异携带者,可进一步细分为上述亚型。

依据患者临床表现和基因型难以进行临床分型时,建议定期随访后依据患者的临床表现和病情发展变化再进行分型,或进行骨骼肌病理学检查根据抗肌萎缩蛋白的表达情况进行分型。DMD 患者抗肌萎缩蛋白-C 端结构域的表达通常是完全或几乎完全缺失的,抗肌萎缩蛋白-N 端结构域的表达通常类似于 C 端,但表达量可稍多于 C 端,抗肌萎缩蛋白-R 端结构域的表达程度不一^[12, 66-67]。一些 DMD 患者可出现少量的突变修复肌纤维^[68],对疾病的分类没有影响。BMD 患者抗肌萎缩蛋白-C 端结构域的表达从部分下降到几乎正常表达均存在,抗肌萎缩蛋白-N 端和 R 端结构域的表达从阴性表达达到阳性表达均存在^[1, 12, 14, 66-67, 69]。

根据抗肌萎缩蛋白的表达情况进行临床分型时需考虑到一些特殊情况,如 DMD 基因重要功能结构域的致病性错义变异或框内变异,其抗肌萎缩

蛋白的表达情况类似于 BMD,但患者的临床表型通常是 DMD(详见“DMD 基因变异的临床遗传学解读”一节)。针对这些特殊情况,当患者年龄较小时,建议多次随访后依据患者的临床表现和病情发展变化再进行临床分型。

推荐意见 6:为提高该病的诊断效率,建议基层医院医师疑诊该病时转诊到上一级有肌病诊治经验的医院。

推荐意见 7:依据患者临床表现和肌酸激酶水平做出临床诊断,在此基础上进行基因检测。

推荐意见 8:肌肉活检并不能作为诊断抗肌萎缩蛋白病的常规检查,只有在临床疑似抗肌萎缩蛋白病,但临床、实验室、影像和基因检测不能证实的病例才考虑进行肌肉活检。

推荐意见 9:进行肌肉活检的医院需要具备熟练的手术医师、神经病理学专家以及专业的神经病理实验室。

推荐意见 10:该病的临床分型诊断由能够对患者进行随访的高年资医师告知患者或其家属。

推荐意见 11:DMD 基因检测是诊断该病的首选金标准,能够降低肌肉活检的使用率以及帮助判断病情发展和预后,为后续的随访检查提供依据,依据本指南进行的相关基因检测建议在医保或保险覆盖范围内。

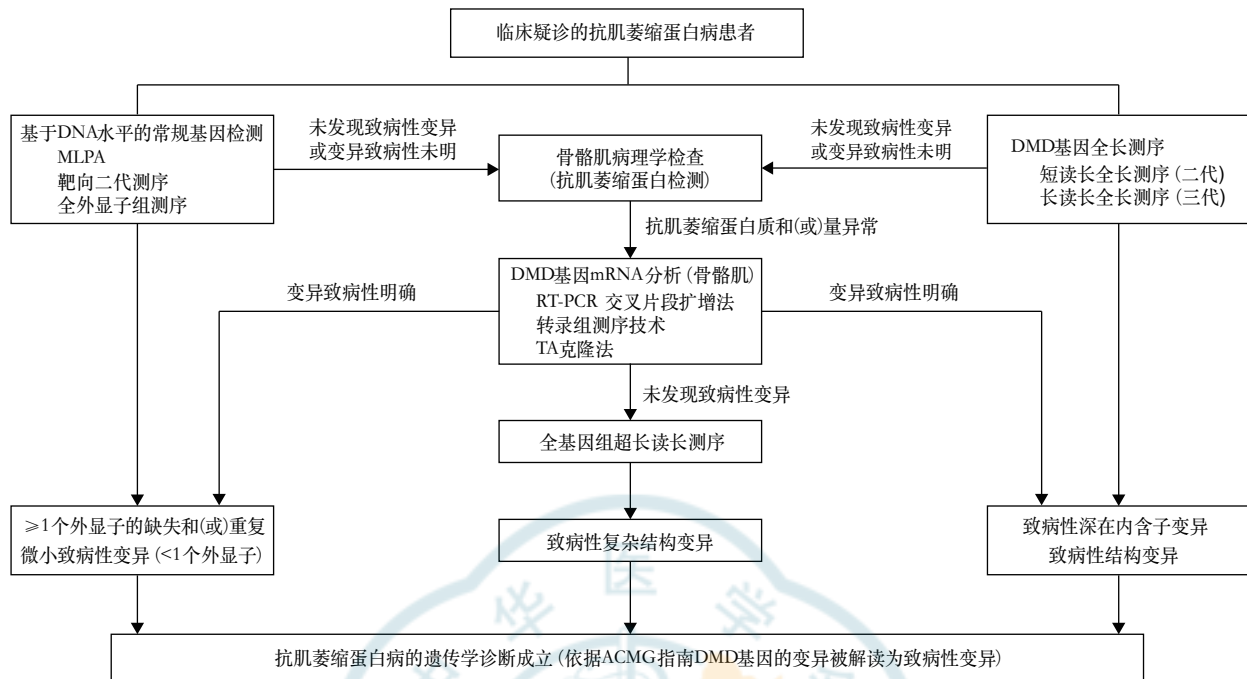
五、遗传学诊断流程

基于上述临床诊断,建议首先进行常规基因检测,用于鉴定 DMD 基因的经典变异,而 DMD 基因非经典变异的鉴定相对复杂而困难,需要针对 DMD 基因的 DNA 水平、蛋白水平以及 mRNA 水平综合应用多种分子遗传学检测方法(图 2)。遗传学诊断流程发现的 DMD 基因变异需要根据美国医学遗传学与基因组学学会指南^[70-71]进行致病性的解读,其中关于变异的剪接影响,除了 mRNA 水平的证据外,还需考虑变异是否遵循公认的剪接规则,可以结合剪接算法的预测结果加以判断,可以使用 Human Splicing Finder^[72]和 SpliceAI^[73]。

(一)男性患者

1. 常规基因检测:DNA 水平的常规基因检测^[9-12]主要用于鉴定 DMD 基因的经典变异,包括多重连接依赖式探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)和二代测序,二代测序可以是针对神经肌肉病的靶向二代测序^[74],也可以是全外显子组测序。对于 MLPA 发现的单个外显子水平的缺失/重复变异,应当进





注:MLPA为多重连接依赖式探针扩增技术;RT-PCR为逆转录-聚合酶链式反应;ACMG为美国医学遗传学与基因组学学会

图2 抗肌萎缩蛋白病遗传学诊断流程图^[9-10, 12]

行荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)及一代测序验证。对于二代测序检测到的外显子缺失/重复变异,可以进行MLPA或qPCR的验证。当未发现DMD基因的致病性外显子缺失/重复变异以及微小致病性变异时,或发现的DMD基因变异致病性未明时(特别是同义变异、错义变异以及位于非经典剪接区域的微小变异),需要进行遗传学诊断流程的进一步检查。

2. DMD基因全长测序:DMD基因全长测序既可鉴定经典变异,也可鉴定非经典变异,目前可以采用短读长测序(二代测序)或长读长测序(三代测序)技术进行DMD基因的全长测序。DMD基因短读长全长测序^[10]和DMD基因长读长全长测序^[10, 75]均可用于检测DMD基因的深在内含子变异以及结构变异,但对于复杂结构变异,DMD基因长读长全长测序更具优势。当未发现DMD基因的致病性深在内含子变异以及结构变异致病性未明时,需要进行基于骨骼肌的抗肌萎缩蛋白和(或)量的分析以及DMD基因mRNA分析。

3. 抗肌萎缩蛋白及DMD基因mRNA分析:骨骼肌病理学检查是疾病诊断和鉴别诊断的重要方法,需要进行常规的组织学、酶组织化学和免疫组织化学染色。抗肌萎缩蛋白的表达情况可采用免疫组织化学染色或免疫荧光染色进行分析,需采用

针对抗肌萎缩蛋白-N端、C端及R端结构域的单克隆抗体进行免疫染色。如临床表型高度怀疑抗肌萎缩蛋白病,但抗肌萎缩蛋白-N端、C端及R端均正常或几乎正常表达时,应当采用蛋白质印迹法分析抗肌萎缩蛋白分子量的变化,如发现抗肌萎缩蛋白存在分子量的异常,亦可确诊为抗肌萎缩蛋白病。当骨骼肌病理学检查发现抗肌萎缩蛋白存在质和(或)量的异常并且DMD基因致病性变异未明时,需进行DMD基因mRNA分析。DMD基因mRNA分析可采用逆转录-聚合酶链式反应交叉片段扩增法^[10]或转录组测序技术^[12, 75]进行分析,但转录组测序发现的DMD基因异常转录本,需进行逆转录-聚合酶链式反应的验证。对于逆转录-聚合酶链式反应交叉片段扩增法或转录组测序无法明确的异常转录本,如异常转录本中存在重复序列或异常转录本与正常转录本的序列难以辨别时,需要进行TA克隆以明确异常转录本的具体序列^[12]。

当鉴定出DMD基因的异常转录本时,需考虑以下两种情况^[10, 12, 58, 75-77]:(1)当患者DMD基因的DNA序列存在致病性未明的变异时(常规基因检测和DMD基因全长测序中发现的变异),如果异常转录本的序列与DNA水平的变异是遵循公认剪接规则的,则认为该变异是影响剪接的并且是致病的,否则需要进一步的基因检测;(2)常规基因检测和DMD基因全长测序中未发现可能的致病性变异

时,也需要进行进一步的基因检测。

4. 全基因组超长读长测序:全基因组水平的超长读长测序^[9]可用于鉴定超大范围的复杂结构变异以及断裂点位于基因组高度重复序列中的复杂结构变异。对于 DMD 基因长读长全长测序无法明确的复杂结构变异,也可应用全基因组超长读长测序进行明确。

(二)女性患者

首先进行上述遗传学诊断流程的常规基因检测^[14],如发现女性患者携带 DMD 基因致病性杂合变异时,由于大部分女性患者是因为 X 染色体偏倚失活而导致发病,需进一步进行 X 染色体失活检测^[43];如发现女性患者 DMD 基因存在致病性纯合或复合杂合变异时,则可不进行 X 染色体失活检测。当患者 DMD 基因存在致病性纯合变异时,需考虑存在罕见单亲二体的可能^[78],可再次分析二代测序数据寻找单亲二体的证据,也可应用微卫星标记分析或单核苷酸多态性微阵列分析单亲二体的可能。对于在常规基因检测中未能发现致病性变异的女性患者,首先考虑进行核型分析,以除外罕见的特殊变异类型,包括 X 染色体与常染色体的平衡易位^[79]、Turner 综合征(45, X)^[80]、雄激素不敏感综合征合并 DMD 基因致病性变异(46, XY;男性假两性畸形)^[81]。如经过常规基因检测以及核型分析后,仍未发现可能的致病性变异时,建议依次进行上述遗传学诊断流程的进一步检查。

推荐意见 12: 基因检测应当在明确患者肌酸激酶水平之后进行。

推荐意见 13: 对致病性变异未明和临床分型难以确定的患者进行骨骼肌病理学检查。

推荐意见 14: 阅读框理论不适用于女性患者的表型预测,可以通过 X 染色体失活检测、骨骼肌磁共振检查和骨骼肌病理学检查判断疾病严重程度。

六、DMD 基因变异的临床遗传学解读

DNA 层面的微小插入/缺失变异、外显子缺失/重复变异和结构变异在 mRNA 水平可以导致终止或移码转录本的形成(框外变异),也可以导致框内转录本的形成(框内变异)。框外变异在 mRNA 水平将形成一个早发的终止密码子,通过无义介导的 mRNA 降解途径(nonsense-mediated decay, NMD)引起相应转录本的降解,低量逃逸 NMD 降解机制的框外转录本可以翻译出少量异常的抗肌萎缩蛋白,但异常的抗肌萎缩蛋白因缺乏羧基端而无

功能且易于降解,最终导致抗肌萎缩蛋白的表达完全缺失或严重下降,导致 DMD 表型^[82-83]。框内变异在 mRNA 水平维持了开放阅读框的密码子顺序,相应转录本翻译出截短或延长但保留部分功能的抗肌萎缩蛋白,导致 BMD 表型^[82-83]。上述基因型-表型的关系被称为阅读框理论^[84-85],93%~96% 的抗肌萎缩蛋白病患者符合阅读框理论^[6, 61]。

(一)外显子缺失/重复变异

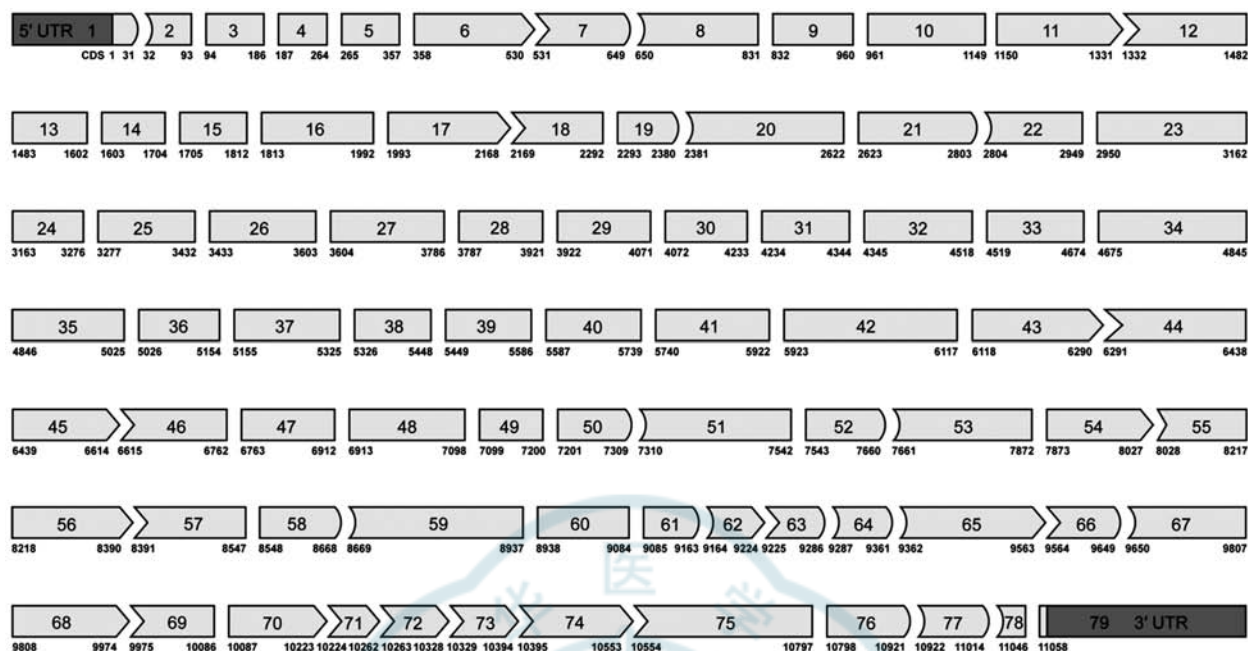
DMD 基因绝大多数的外显子缺失/重复变异是致病的。大多数 DMD 基因的重复变异是串联重复的,但也存在非串联重复的情况,如重复的外显子可能位于 DMD 基因的其他内含子甚至是 DMD 基因外的基因组区域中^[86],此时, DMD 基因的重复变异可能是不致病的。DMD 基因的外显子缺失/重复变异既可以是框外变异,也可以是框内变异,图 3 展示了 DMD 基因全长转录本 NM_004006.2 的结构示意图,可供临床医师或相关实验室人员直观地判断 DMD 基因外显子缺失/重复变异对开放阅读框的影响。

DMD 基因外显子缺失/重复变异中不符合阅读框理论的情况主要有以下三种:(1)框外变异引起异常剪接,形成框内转录本,如某些特殊类型的 45 号外显子缺失变异可以导致 mRNA 水平形成 44~45 号外显子跳跃的框内转录本,引起 BMD 表型^[87];(2)位于抗肌萎缩蛋白重要功能结构域的框内变异可导致 DMD 表型,如同时破坏了肌动蛋白结合区 1 和肌动蛋白结合区 2 的框内缺失变异,或为破坏了半胱氨酸富集区的框内缺失变异,尽管患者抗肌萎缩蛋白的表达情况类似于 BMD,但患者的表型为 DMD^[88];(3)阅读框理论并不适用于非串联重复变异,虽然 MLPA 可以检测到 DMD 基因外显子水平的重复变异,但其并不能确定重复的外显子在基因组中的位置和方向,因此,在解读由 MLPA 检测到的重复变异时,应用阅读框理论需特别谨慎。

(二)微小插入/缺失变异

大多数 DMD 基因的微小插入/缺失变异符合阅读框理论,不符合阅读框理论的情况见于:(1)位于抗肌萎缩蛋白重要功能结构域(肌动蛋白结合区、半胱氨酸富集区或 β -抗肌萎缩蛋白相关糖蛋白结合区)的框内微小插入/缺失变异可导致 DMD 表型;(2)当位于框内外显子的移码微小插入/缺失变异破坏了原有的剪接增强子和(或)形成新的剪接抑制子之后,可引起相应框内外显子的跳跃而形成





注:外显子与外显子交界处的圆弧形曲线指代1 bp,三角形突出指代2 bp;UTR为非翻译区;DMD为抗肌萎缩蛋白

图3 DMD基因全长转录本NM_004006.2的结构示意图

框内转录本,进而导致BMD表型^[89-90]。

(三)单核苷酸变异

DNA层面的单核苷酸变异在mRNA水平可以表现为同义变异、错义变异、无义/终止变异或剪接变异。DMD基因绝大多数的无义变异引起DMD表型,下列情况可出现BMD表型:(1)少数位于框内外显子的无义变异可引起相应外显子的跳跃而形成框内转录本,导致BMD表型^[90-91];(2)位于78号外显子的无义变异有可能逃逸NMD降解机制,引起BMD表型;(3)位于DMD基因1号和2号外显子的无义变异有可能激活位于6号外显子的候选起始密码子,翻译出有功能的抗肌萎缩蛋白,导致BMD表型^[33]。

DMD基因致病性错义变异多见于BMD,但也可导致DMD或XLDCM^[14]。位于肌动蛋白结合区1结构域的致病性错义变异通常引起BMD,而位于羧基端ZZ结构域的致病性错义变异通常引起DMD,原因在于ZZ结构域的致病性错义变异破坏了抗肌萎缩蛋白与 β -肌营养不良蛋白聚糖的结合^[92-93]。少数DMD基因的错义变异有可能引起异常剪接而产生框外转录本,引起DMD表型^[89]。

绝大多数的DMD基因同义变异不致病,但当同义变异影响了必要性剪接信号和(或)剪接调控元件时可引起异常剪接,导致抗肌萎缩蛋白产生质和(或)量的异常,此时的同义变异是致病的^[94]。

经典剪接位点变异的致病性是明确的,但其对

开放阅读框的影响是无法预测的(既可能是框外转录本,也可能是框内转录本,甚至是两者皆有之),目前只能依赖于DMD基因mRNA分析。因此,对于这类患者的临床分型主要依赖于对患者的临床表现、病情发展变化以及抗肌萎缩蛋白的表达情况进行综合分析。

(四)非经典变异

由于DMD基因致病性非经典变异的鉴定过程涉及抗肌萎缩蛋白质和(或)量的分析以及DMD基因mRNA分析,因此,可以根据DMD基因mRNA分析的结果直接判断非经典变异对于开放阅读框的影响,同时结合抗肌萎缩蛋白质和(或)量分析的结果以及患者的临床表现进行临床分型。

推荐意见 15: 阅读框理论适用于我国抗肌萎缩蛋白病患者的表型预测。

推荐意见 16: 依据患者的基因型预测临床表型时,建议结合患者的临床发病时间、病情发展变化、肌酸激酶水平、骨骼肌磁共振以及心脏检查结果综合判断。

七、临床遗传咨询

临床遗传咨询应在患者及家属充分知情的前提下,由患者及家属做出合适的决定。临床遗传咨询的主要目的是降低该病继续遗传的风险,应当由具有遗传咨询资质的专业人员进行。抗肌萎缩蛋白病的遗传方式为X-连锁隐性遗传,女性致病性变异携带者有50%的概率将致病性变异传递给子



代胎儿,因DMD基因致病性变异在男性中完全外显,男性胎儿遗传致病性变异后会成为患者,女性胎儿遗传致病性变异后会成为新的携带者,也有可能因为X染色体偏倚失活等机制成为患者。

已生育过1例抗肌萎缩蛋白病患者或女性DMD基因致病性变异携带者的母亲,无论是否为DMD基因致病性变异携带者,再次妊娠后均建议进行产前诊断,因存在生殖细胞嵌合体的可能。建议在妊娠11~13⁺₆周取胎盘绒毛或18~24周取羊水进行产前诊断,明确胎儿是否携带有与先证者相同的DMD基因致病性变异^[14-15]。男性DMD患者通常因为病情严重或过早死亡而无法生育后代,男性BMD或XLDCM患者有可能生育后代,患者的女儿必定是携带者。因此,其女儿在生育时建议进行遗传咨询。

推荐意见 17: 高风险人群孕前及孕早期检查中常规进行DMD基因检测。

推荐意见 18: 女性DMD基因致病性变异携带者通过产前诊断或试管婴儿可以避免致病性变异的继续遗传,减轻家庭及社会负担,进行产前诊断或试管婴儿的相关费用建议在医保或保险覆盖范围内。

抗肌萎缩蛋白病的精准诊断和临床分型涉及多学科专家的诊疗合作。本指南借鉴国内外近年抗肌萎缩蛋白病的指南共识和研究进展,经过不同领域的26位专家的研讨和反馈,结合我国的国情,多次修改后形成定稿。由于我国地域辽阔,各个地区的医疗水平和卫生政策存在差异,本指南仅代表撰写专家组的观点,其主要目的是为广大的医务人员和政府管理人员的工作提供参考,并不具备任何法律效力。未来,随着抗肌萎缩蛋白病研究进展和基因检测技术的不断完善,将为本指南后续的更新修订提供更高价值的证据和指导。

本指南制订专家委员会名单

学术顾问: 张学(哈尔滨医科大学)

执笔者: 谢志颖(北京大学第一医院神经内科)

专家委员会成员(按姓氏汉语拼音排列): 陈万金(福建医科大学附属第一医院神经内科); 陈凯珊(香港大学玛丽医院儿童脑神经内科); 戴毅(北京协和医院神经内科); 洪道俊(南昌大学第一附属医院神经内科); 洪思琦(重庆医科大学附属儿童医院神经内科); 胡静(河北医科大学第三医院神经肌肉病科); 孔祥东(郑州大学第一附属医院遗传与产前诊断中心); 李西华(复旦大学附属儿科医院神经内科); 吕俊兰(国家儿童医学中心,首都医科大学附属北京儿童医院神经内科); 马祎楠(北京大学第一医院实验中心); 彭镜(中南大学

湘雅医院儿童医学中心); 沈亦平(哈佛医学院波士顿儿童医院遗传与基因组部); 王柠(福建医科大学附属第一医院神经内科); 王朝霞(北京大学第一医院神经内科); 吴丽文(湖南省儿童医院神经内科); 吴士文(解放军总医院第一医学中心神经内科); 谢志颖(北京大学第一医院神经内科); 熊晖(北京大学第一医院儿科); 焉传祝(山东大学齐鲁医院神经内科); 姚生(解放军总医院第六医学中心神经内科); 闫丽盈(北京大学第三医院妇产科生殖医学中心); 袁妮(大连医科大学公共卫生学院); 袁云(北京大学第一医院神经内科); 张成(中山大学附属第一医院神经内科); 张巍(北京大学第一医院神经内科); 张学(哈尔滨医科大学)

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Kunkel LM, Hejtmancik JF, Caskey CT, et al. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nature*, 1986, 322(6074):73-77. DOI: 10.1038/322073a0.
- [2] Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes[J]. *Lancet Neurol*, 2003, 2(12): 731-740. DOI: 10.1016/s1474-4422(03)00585-4.
- [3] Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2020, 15(1): 141. DOI: 10.1186/s13023-020-01430-8.
- [4] Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy[J]. *Lancet*, 1991, 337(8748): 1022-1024. DOI: 10.1016/0140-6736(91)92671-n.
- [5] Salari N, Fatahi B, Valipour E, et al. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2022, 17(1):96. DOI: 10.1186/s13018-022-02996-8.
- [6] Bladen CL, Salgado D, Monges S, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7, 000 Duchenne muscular dystrophy mutations[J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(4):395-402. DOI: 10.1002/humu.22758.
- [7] Barseghyan H, Tang W, Wang RT, et al. Next-generation mapping: a novel approach for detection of pathogenic structural variants with a potential utility in clinical diagnosis[J]. *Genome Med*, 2017, 9(1):90. DOI: 10.1186/s13073-017-0479-0.
- [8] Neri M, Rossi R, TrabANELLI C, et al. The genetic landscape of dystrophin mutations in Italy: a nationwide study[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 131. DOI: 10.3389/fgene.2020.00131.
- [9] Xie Z, Sun C, Zhang S, et al. Long-read whole-genome sequencing for the genetic diagnosis of dystrophinopathies[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, 7(10):2041-2046. DOI: 10.1002/actn.351201.
- [10] Xie Z, Sun C, Liu Y, et al. Practical approach to the genetic diagnosis of unsolved dystrophinopathies: a stepwise strategy in the genomic era[J]. *J Med Genet*, 2021, 58(11): 743-751. DOI: 10.1136/jmedgenet-2020-107113.



- [11] Xie Z, Liu C, Lu Y, et al. Exonization of a deep intronic long interspersed nuclear element in Becker muscular dystrophy[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 979732. DOI: 10.3389/fgene.2022.979732.
- [12] Xie Z, Sun C, Liu C, et al. Clinical, muscle imaging, and genetic characteristics of dystrophinopathies with deep-intronic DMD variants[J]. *J Neurol*, 2023, 270(2): 925-937. DOI: 10.1007/s00415-022-11432-0.
- [13] Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management[J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(3): 251-267. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30024-3.
- [14] Fratter C, Dalgleish R, Allen SK, et al. EMQN best practice guidelines for genetic testing in dystrophinopathies[J]. *Eur J Hum Genet*, 2020, 28(9): 1141-1159. DOI: 10.1038/s41431-020-0643-7.
- [15] 北京医学会罕见病分会, 北京医学会神经内科分会神经肌肉病学组, 中国肌营养不良协作组. Duchenne 型肌营养不良多学科管理专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(35): 2803-2814. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.35.008.
- [16] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会神经肌肉病学组, 中华医学会神经病学分会心电图与临床神经生理学组. 中国假肥大型肌营养不良症诊治指南[J]. *中华神经科杂志*, 2016, 49(1): 17-20. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2016.01.004.
- [17] Gardner-Medwin D, Bunday S, Green S. Early diagnosis of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Lancet*, 1978, 1(8073): 1102. DOI: 10.1016/S0140-6736(78)90949-2.
- [18] Battini R, Chieffo D, Bulgheroni S, et al. Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: the role of executive functions[J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(2): 122-128. DOI: 10.1016/j.nmd.2017.11.018.
- [19] Ricotti V, Mandy WP, Scoto M, et al. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2016, 58(1): 77-84. DOI: 10.1111/dmcn.12922.
- [20] Mercuri E, Muntoni F, Osorio AN, et al. Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study [J]. *J Comp Eff Res*, 2020, 9(5): 341-360. DOI: 10.2217/ce-2019-0171.
- [21] Li W, Zheng Y, Zhang W, et al. Progression and variation of fatty infiltration of the thigh muscles in Duchenne muscular dystrophy, a muscle magnetic resonance imaging study[J]. *Neuromuscul Disord*, 2015, 25(5): 375-380. DOI: 10.1016/j.nmd.2015.01.003.
- [22] Chan KG, Galasko CS, Delaney C. Hip subluxation and dislocation in Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Pediatr Orthop B*, 2001, 10(3): 219-225.
- [23] Li X, Lv J, Zhu W, et al. A 1-year analysis from a natural history study in Chinese individuals with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2024, 42: 100944. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2023.100944.
- [24] McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, et al. The cooperative international neuromuscular research group Duchenne natural history study—a longitudinal investigation in the era of glucocorticoid therapy: design of protocol and the methods used[J]. *Muscle Nerve*, 2013, 48(1): 32-54. DOI: 10.1002/mus.23807.
- [25] Kamdar F, Garry DJ. Dystrophin-deficient cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(21): 2533-2546. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.02.081.
- [26] Nigro G, Comi LI, Politano L, et al. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Int J Cardiol*, 1990, 26(3): 271-277. DOI: 10.1016/0167-5273(90)90082-g.
- [27] 郑奎, 武菲, 张英谦, 等. 抗肌萎缩蛋白基因突变导致心脏损害的诊疗进展 [J]. *中华医学杂志*, 2023, 103(27): 2128-2132. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20230327-00482.
- [28] Landfeldt E, Thompson R, Sejersen T, et al. Life expectancy at birth in Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Epidemiol*, 2020, 35(7): 643-653. DOI: 10.1007/s10654-020-00613-8.
- [29] Santos R, Gonçalves A, Oliveira J, et al. New variants, challenges and pitfalls in DMD genotyping: implications in diagnosis, prognosis and therapy[J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(8): 454-464. DOI: 10.1038/jhg.2014.54.
- [30] Manzur AY, Muntoni F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2009, 80(7): 706-714. DOI: 10.1136/jnnp.2008.158329.
- [31] Bushby KM, Gardner-Medwin D. The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. I. Natural history[J]. *J Neurol*, 1993, 240(2): 98-104. DOI: 10.1007/BF00858725.
- [32] Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, et al. Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years[J]. *Eur Neurol*, 1999, 42(3): 145-149. DOI: 10.1159/000008089.
- [33] Gurvich OL, Maiti B, Weiss RB, et al. DMD exon 1 truncating point mutations: amelioration of phenotype by alternative translation initiation in exon 6[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(4): 633-640. DOI: 10.1002/humu.20913.
- [34] Straub V, Guglieri M. An update on Becker muscular dystrophy[J]. *Curr Opin Neurol*, 2023, 36(5): 450-454. DOI: 10.1097/WCO.0000000000001191.
- [35] Clemens PR, Niizawa G, Feng J, et al. The CINRG Becker natural history study: baseline characteristics[J]. *Muscle Nerve*, 2020, 62(3): 369-376. DOI: 10.1002/mus.27011.
- [36] Nakamura A, Matsumura T, Ogata K, et al. Natural history of Becker muscular dystrophy: a multicenter study of 225 patients[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2023, 10(12): 2360-2372. DOI: 10.1002/acn.351925.
- [37] Melacini P, Fanin M, Danieli GA, et al. Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy[J]. *Circulation*, 1996, 94(12): 3168-3175. DOI: 10.1161/01.cir.94.12.3168.
- [38] Kaspar RW, Allen HD, Ray WC, et al. Analysis of dystrophin deletion mutations predicts age of cardiomyopathy onset in becker muscular dystrophy[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2(6): 544-551. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.867242.
- [39] Restrepo-Cordoba MA, Wahbi K, Florian AR, et al. Prevalence and clinical outcomes of dystrophin-associated dilated cardiomyopathy without



- severe skeletal myopathy[J]. *Eur J Heart Fail*, 2021, 23(8): 1276-1286. DOI: 10.1002/ehf.2250.
- [40] Finsterer J, Stöllberger C. The heart in human dystrophinopathies[J]. *Cardiology*, 2003, 99(1): 1-19. DOI: 10.1159/000068446.
- [41] Nakamura A. X-Linked dilated cardiomyopathy: a cardiospecific phenotype of dystrophinopathy[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2015, 8(2): 303-320. DOI: 10.3390/ph8020303.
- [42] Johnson R, Otway R, Chin E, et al. DMD-associated dilated cardiomyopathy: genotypes, phenotypes, and phenocopies[J]. *Circ Genom Precis Med*, 2023, 16(5): 421-430. DOI: 10.1161/CIRCGEN.123.004221.
- [43] Liu C, Ma J, Lu Y, et al. Clinical, pathological, and genetic characterization in a large Chinese cohort with female dystrophinopathy[J]. *Neuromuscul Disord*, 2023, 33(10): 728-736. DOI: 10.1016/j.nmd.2023.08.008.
- [44] Zhong J, Xie Y, Bhandari V, et al. Clinical and genetic characteristics of female dystrophinopathy carriers[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 3035-3044. DOI: 10.3892/mmr.2019.9982.
- [45] McCaffrey T, Guglieri M, Murphy AP, et al. Cardiac involvement in female carriers of duchenne or becker muscular dystrophy[J]. *Muscle Nerve*, 2017, 55(6): 810-818. DOI: 10.1002/mus.25445.
- [46] Hoogerwaard EM, Bakker E, Ippel PF, et al. Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study[J]. *Lancet*, 1999, 353(9170): 2116-2119. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)10028-4.
- [47] Ishizaki M, Kobayashi M, Adachi K, et al. Female dystrophinopathy: review of current literature[J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(7): 572-581. DOI: 10.1016/j.nmd.2018.04.005.
- [48] Schade van Westrum SM, Hoogerwaard EM, Dekker L, et al. Cardiac abnormalities in a follow-up study on carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy[J]. *Neurology*, 2011, 77(1): 62-66. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318221ad14.
- [49] Tuffery-Giraud S, Miro J, Koenig M, et al. Normal and altered pre-mRNA processing in the DMD gene[J]. *Hum Genet*, 2017, 136(9): 1155-1172. DOI: 10.1007/s00439-017-1820-9.
- [50] McNaughton JC, Hughes G, Jones WA, et al. The evolution of an intron: analysis of a long, deletion-prone intron in the human dystrophin gene[J]. *Genomics*, 1997, 40(2): 294-304. DOI: 10.1006/geno.1996.4543.
- [51] Pozzoli U, Elgar G, Cagliani R, et al. Comparative analysis of vertebrate dystrophin loci indicate intron gigantism as a common feature[J]. *Genome Res*, 2003, 13(5): 764-772. DOI: 10.1101/gr.776503.
- [52] Oshima J, Magner DB, Lee JA, et al. Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements[J]. *Hum Genet*, 2009, 126(3): 411-423. DOI: 10.1007/s00439-009-0679-9.
- [53] Gonçalves A, Oliveira J, Coelho T, et al. Exonization of an intronic LINE-1 element causing Becker muscular dystrophy as a novel mutational mechanism in dystrophin gene[J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(10): 253. DOI: 10.3390/genes8100253.
- [54] Ling C, Dai Y, Fang L, et al. Exonic rearrangements in DMD in Chinese Han individuals affected with Duchenne and Becker muscular dystrophies[J]. *Hum Mutat*, 2020, 41(3): 668-677. DOI: 10.1002/humu.23953.
- [55] Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, et al. ATR regulates fragile site stability[J]. *Cell*, 2002, 111(6): 779-789. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01113-3.
- [56] Delalande O, Molza AE, Dos Santos Morais R, et al. Dystrophin's central domain forms a complex filament that becomes disorganized by in-frame deletions[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(18): 6637-6646. DOI: 10.1074/jbc.M117.809798.
- [57] de Feraudy Y, Ben Yaou R, Wahbi K, et al. Very low residual dystrophin quantity is associated with milder dystrophinopathy[J]. *Ann Neurol*, 2021, 89(2): 280-292. DOI: 10.1002/ana.25951.
- [58] Xie Z, Tang L, Xie Z, et al. Splicing characteristics of dystrophin pseudoexons and identification of a novel pathogenic intronic variant in the DMD gene[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(10): 1180. DOI: 10.3390/genes11101180.
- [59] Xie Z, Lu Y, Liu C, et al. Cryptic exon activation caused by a novel deep-intronic splice-altering variant in Becker muscular dystrophy[J]. *J Clin Lab Anal*, 2023, 37(21-22): e24987. DOI: 10.1002/jcla.24987.
- [60] Tong YR, Geng C, Guan YZ, et al. A comprehensive analysis of 2013 dystrophinopathies in China: a report from national rare disease center[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 572006. DOI: 10.3389/fneur.2020.572006.
- [61] Tuffery-Giraud S, Bérout C, Leturcq F, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(6): 934-945. DOI: 10.1002/humu.20976.
- [62] Zhang S, Qin D, Wu L, et al. Genotype characterization and delayed loss of ambulation by glucocorticoids in a large cohort of patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2021, 16(1): 188. DOI: 10.1186/s13023-021-01837-x.
- [63] Ma P, Zhang S, Zhang H, et al. Comprehensive genetic characteristics of dystrophinopathies in China[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2018, 13(1): 109. DOI: 10.1186/s13023-018-0853-z.
- [64] Kong X, Zhong X, Liu L, et al. Genetic analysis of 1 051 Chinese families with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy[J]. *BMC Med Genet*, 2019, 20(1): 139. DOI: 10.1186/s12881-019-0873-0.
- [65] Bello L, Morgenroth LP, Gordish-Dressman H, et al. DMD genotypes and loss of ambulation in the CINRG Duchenne Natural History Study[J]. *Neurology*, 2016, 87(4): 401-409. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002891.
- [66] Arahata K, Beggs AH, Honda H, et al. Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy[J]. *J Neurol Sci*, 1991, 101(2): 148-156. DOI: 10.1016/0022-510x(91)90039-a.
- [67] Li X, Zhao L, Zhou S, et al. A comprehensive database of Duchenne and Becker muscular dystrophy patients (0-18 years old) in East China[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2015, 10: 5. DOI: 10.1186/s13023-014-0220-7.
- [68] Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, et al. Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: implication for clinical trials[J]. *Neuromuscul*



- Disord, 2010, 20(5): 295-301. DOI: 10.1016/j.nmd.2010.03.007.
- [69] Bushby KM, Gardner-Medwin D, Nicholson LV, et al. The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities[J]. J Neurol, 1993, 240(2):105-112. DOI: 10.1007/BF00858726.
- [70] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med, 2015, 17(5):405-424. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- [71] Walker LC, Hoya M, Wiggins G, et al. Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: recommendations from the ClinGen SVI Splicing Subgroup [J]. Am J Hum Genet, 2023, 110(7): 1046-1067. DOI: 10.1016/j.ajhg.2023.06.002.
- [72] Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(9): e67. DOI: 10.1093/nar/gkp215.
- [73] Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, et al. Predicting splicing from primary sequence with deep learning[J]. Cell, 2019, 176(3): 535-548. e24. DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.015.
- [74] Xie Z, Hou Y, Yu M, et al. Clinical and genetic spectrum of sarcoglycanopathies in a large cohort of Chinese patients [J]. Orphanet J Rare Dis, 2019, 14(1): 43. DOI: 10.1186/s13023-019-1021-9.
- [75] Okubo M, Noguchi S, Awaya T, et al. RNA-seq analysis, targeted long-read sequencing and in silico prediction to unravel pathogenic intronic events and complicated splicing abnormalities in dystrophinopathy[J]. Hum Genet, 2023, 142(1): 59-71. DOI: 10.1007/s00439-022-02485-2.
- [76] Waldrop MA, Moore SA, Mathews KD, et al. Intron mutations and early transcription termination in Duchenne and Becker muscular dystrophy[J]. Hum Mutat, 2022, 43(4):511-528. DOI: 10.1002/humu.24343.
- [77] Waddell LB, Bryen SJ, Cummings BB, et al. WGS and RNA studies diagnose noncoding DMD variants in males with high creatine kinase[J]. Neurol Genet, 2021, 7(1): e554. DOI: 10.1212/NXG.0000000000000554.
- [78] Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, et al. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy[J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(1): 160-165.
- [79] Trippe H, Wiczorek S, Kötting J, et al. Xp21/A translocation: a rarely considered genetic cause for manifesting carriers of duchenne muscular dystrophy[J]. Neuropediatrics, 2014, 45(5): 333-335. DOI: 10.1055/s-0034-1383824.
- [80] Verma S, Goyal P, Beam C, et al. Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy[J]. Muscle Nerve, 2017, 56(2):E12-E15. DOI: 10.1002/mus.25618.
- [81] Katayama Y, Tran VK, Hoan NT, et al. Co-occurrence of mutations in both dystrophin-and androgen-receptor genes is a novel cause of female Duchenne muscular dystrophy[J]. Hum Genet, 2006, 119(5): 516-519. DOI: 10.1007/s00439-006-0159-4.
- [82] Dietz HC. New therapeutic approaches to mendelian disorders[J]. N Engl J Med, 2010, 363(9): 852-863. DOI: 10.1056/NEJMra0907180.
- [83] Gao QQ, McNally EM. The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy[J]. Compr Physiol, 2015, 5(3):1223-1239. DOI: 10.1002/cphy.c140048.
- [84] Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, et al. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus[J]. Genomics, 1988, 2(1): 90-95. DOI: 10.1016/0888-7543(88)90113-9.
- [85] Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion[J]. Am J Hum Genet, 1989, 45(4):498-506.
- [86] Ankala A, Kohn JN, Hegde A, et al. Aberrant firing of replication origins potentially explains intragenic nonrecurrent rearrangements within genes, including the human DMD gene[J]. Genome Res, 2012, 22(1): 25-34. DOI: 10.1101/gr.123463.111.
- [87] Dwianingsih EK, Malueka RG, Nishida A, et al. A novel splicing silencer generated by DMD exon 45 deletion junction could explain upstream exon 44 skipping that modifies dystrophinopathy[J]. J Hum Genet, 2014, 59(8): 423-429. DOI: 10.1038/jhg.2014.36.
- [88] Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy[J]. J Med Genet, 2016, 53(3): 145-151. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103387.
- [89] Juan-Mateu J, González-Quereda L, Rodríguez MJ, et al. Interplay between DMD point mutations and splicing signals in Dystrophinopathy phenotypes[J]. PLoS One, 2013, 8(3):e59916. DOI: 10.1371/journal.pone.0059916.
- [90] Okubo M, Noguchi S, Hayashi S, et al. Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy[J]. Hum Genet, 2020, 139(2): 247-255. DOI: 10.1007/s00439-019-02107-4.
- [91] Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, et al. Nonsense mutation-associated Becker muscular dystrophy: interplay between exon definition and splicing regulatory elements within the DMD gene[J]. Hum Mutat, 2011, 32(3):299-308. DOI: 10.1002/humu.21426.
- [92] Vulin A, Wein N, Strandjord DM, et al. The ZZ domain of dystrophin in DMD: making sense of missense mutations [J]. Hum Mutat, 2014, 35(2): 257-264. DOI: 10.1002/humu.22479.
- [93] Henderson DM, Lee A, Ervasti JM. Disease-causing missense mutations in actin binding domain 1 of dystrophin induce thermodynamic instability and protein aggregation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(21): 9632-9637. DOI: 10.1073/pnas.1001517107.
- [94] Jones HF, Bryen SJ, Waddell LB, et al. Importance of muscle biopsy to establish pathogenicity of DMD missense and splice variants[J]. Neuromuscul Disord, 2019, 29(12):913-919. DOI: 10.1016/j.nmd.2019.09.013.

