维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)12-1347-04

Duchenne 肌营养不良症的研究进展

曹俊娟 综 述,柳 青 审 校

(重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R746.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-06

假性肥大型进行性肌营养不良症包括杜兴氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy,DMD)和贝克氏肌营养不良(Becker muscular dystrophy,BMD)两种临床类型,二者是等位基因异质性疾病,发病率分别为活产男婴的 1/3500 和 1/30000。其中 DMD 是肌营养不良症中最常见和最严重的类型,由于基因突变影响 dystrophin 蛋白在横纹肌组织的表达,导致肢体近端骨骼肌进行性萎缩、无力和腓肠肌假性肥大,典型表现为运动发育迟缓甚至倒退,特殊的“鸭步”步态,“Gower 征”。血清 CK 活性升高,心肌细胞损伤,大多在 13 岁之前失去独立行走能力,随着病情加重,20 岁左右死于呼吸衰竭或心脏并发症。最近有研究发现在 DMD 病人的巨噬细胞和肌纤维细胞中 IKK/NF-κB 信号的相互作用助长了肌肉变性[1]。

与 DMD 相比,BMD 起病年龄较晚,症状较轻,进展较缓慢,多于 16 岁之后失去独立行走能力,寿命可达 40~50 岁。由于目前尚无有效的治疗方法,故及时确诊、检出携带者、进行产前诊断以至植入前遗传学诊断和提供正确的遗传咨询成为降低本病发病率的重要措施。

1 DMD 的分子遗传学基础

1987 年,Koenig 等将该基因 cDNA 克隆,继之测序及确定其蛋白产物,为 DMD 的研究开创了新纪元。我国自 1987 年开始对 DMD 的分子遗传学进行了研究。

1.1 dystrophin 基因

DMD 基因定位于 Xp21.2 区域,是目前已知人类最大的基因。在基因组序列上跨越 2500kb,占全部基因组序列长度的 0.1%,占 X 染色体全长的 1.5%。该基因由 79 个外显子和 78 个内含子(占整个基因序列的 99%)构成,含有 7 个组织特异性的启动子。基因结构十分巨大,内部情况高度复杂。

1.2 dystrophin RNA 及 dystrophin 亚型

Dystrophin 基因通过至少 7 个不同的组织特异性启动子,选择性剪接及不同的多聚腺苷酸附加信号可以产生大量的组织特异性 dystrophin 蛋白异构体。

该基因的 cDNA 全长 14kb,有 3 种全长的蛋白异构体,具有相同的外显子数目,分别由不同的组织特异性启动子(脑型 B、肌型 M、蒲肯野细胞型 P)于基因第一个外显子的不同位置启动转录,位于第 1 号外显子的启动子分别与其它 78 个外显子拼接,以其主要表达的场所命名。例如:B 型启动子其产物主要表达大脑皮层和海马回神经元;P 型启动子其产物主要表达小脑蒲肯野细胞,在骨骼肌也有极少量的表达;M 型启动子其产物主要表达骨骼肌和心肌组织,同时在脑神经胶质细胞也有少量表达。肌型 dystrophin 蛋白是该基因多种产物中了解得最清楚的一种[2]。最近有人认为存在另一种全长的淋巴细胞型 dystrophin 蛋白,然而有人认为是人为因素造成的,其功能有待证明。

DMD 基因还有 4 个内部启动子可以启动较短形式的 dystrophin 蛋白转录。它们缺少肌动蛋白锚定终端但保留了富含半胱氨酸区域和羧基末端,因而保留了与完整膜蛋白的结合位点。基因内部的启动子分别以 DMD 基因第 30,45,56,63 号外显子作为第一个外显子启动转录,其产物分别为 260ku (Dp260)、140ku (Dp140)、116ku (Dp116)和 71ku(Dp71)。Dp260 在视网膜中高表达,同时在脑和肌组织中与全长型的 dystrophin 蛋白共表达;Dp140 表达于脑、视网膜和肾组织;Dp116 只在成熟的外周神经组织(雪旺细胞)中表达;Dp71 在包括脑、视网膜、肾、肝、肺等多种组织器官中表达,而不在骨骼肌中表达。

此外,最近国内外很多学者把研究目光转向 dystrophin 基因通过外显子跨越转录或外显子不规则转录等选择性拼接也可产生许多大小不同的 dystrophin 蛋白异构体。选择性拼接有组织特异性,该特异性与 dystrophin 蛋白的表达和功能调节有关,从而产生了 dystrophin 蛋白的多样性。dystrophin 蛋白缺失某些区域可产生高功能的小或微小 dystrophin 蛋白,在转基因小鼠中有很高的阻止肌肉萎缩的功能[3],小或微小 dystrophin 蛋白的研究为构建 DMD 基因治疗的微型 dystrophin 基因提供了客观证据。

1.3 dystrophin 蛋白质结构

dystrophin 蛋白主要表达于骨骼肌、心肌、少量表达于脑组织。全长型的 dystrophin 蛋白 Dp427 是来自 11.1kb 开放读码框架,编码的肽链含 3685 残基,长约 150nm,分子量为 427ku 的棒状蛋白,是一个肌膜下细胞骨架的组成成分,主要定位于肌细胞膜表面,神经肌肉接头沟及肌-键连接处,分为 4 个功能区域[2]:①氨基端区域:与 α-actinin 蛋白同源,

作者介绍:曹俊娟(1979-),女,硕士,
主要研究方向:遗传性疾病的基因诊断。

维普资讯 http://www.cqvip.com

包含第 14~240 氨基酸,跨越 1~8 号外显子,与细胞内的肌动蛋白(F-actin)相连接;②中央棒状区:包含第 253~3040 氨基酸,跨越 9~63 号外显子,由 24 个三聚螺旋状重复结构(Repeat,R)组成,每个重复结构由 109 个氨基酸组成,与 α-肌动蛋白(α-actin)和血影蛋白(Spectrin)同源。重复结构被 4 个富含脯氨酸的铰链(Hinge,H)结构分隔开;③富含半胱氨酸区域:第 3080~3360 氨基酸,跨越 64~68 号外显子,包含有两个 EF 手钙结合位点,与位于肌膜上的糖蛋白复合体相连;④羧基端区域:第 3361~3685 氨基酸,跨越 68~79 号外显子,与细胞内的 syntrophins 蛋白相连。上述 4 个区域的结构和功能不同,受累后产生症状的严重程度亦不一致。N 端和中央棒状区受累可引起轻重不等的 BMD 或 DMD 表型,而半胱氨酸富含区及 C 端前半部的损害则几乎均引起极严重型的 DMD。

2 dystrophin 相关蛋白(utrophin)

近年来,人们不断探索应用转基因疗法治疗 DMD,寻求一种在体内能够过量表达可补偿因 dystrophin 缺失而造成的伤害,而 dystrophin 相关蛋白 utrophin 的发现,恰恰为此开辟了道路。因此,本文有必要对 utrophin 与 dystrophin 的结构功能相关性给予叙述。

Utrophin 由人常染色体 6q24 上的一个基因编码,其 mRNA 长度为 13kb,相对分子质量约为 400。在一些肌病和胚胎发育期位于肌细胞膜下,出生后则局限在神经肌肉接头和肌腱接头,而 dystrophin 则位于肌膜和神经肌肉接头沟。utrophin 与 dystrophin 在氨基酸序列上有很大同源性,它们都含有 4 个不同的结构区:N-端区,含同源重复顺序的棒状区,富含半胱氨酸区和 C 端区。N 端区的前 250 个氨基酸推测为肌动蛋白结合部位,二者在此区有 80%的氨基酸序列同源。utrophin 和 dystrophin 二者在 C 端区高度保守,氨基酸之间有 80%能精确匹配,并且剩下的残基中约有一半是保守的。C 端区的缺失往往会产生严重的 DMD 症状,说明此区对维护 dystrophin 的功能十分重要。utrophin 与 dystrophin 在此区间的强烈保守性预示了 utrophin 可能在 dystrophin 缺失的肌肉中以与 dystrophin 相似的方式结合到肌纤维膜上[4]。

正是由于氨基酸序列的高度同源性及结构相似性,utrophin 才能像 dystrophin 一样结合肌动蛋白,并且随后发挥与 dystrophin 相类似的功能。近来有研究发现 utrophin 的表达随着 DMD 年龄有所增加,而且呈显著的正相关。因此通过 utrophin 增量调节程度与时限来阻止疾病进展,从而改善 DMD 病人的后果[5]。

3 DGC 复合体(The Dystrophin-associated Glycoprotein Complex)

在心肌和骨骼肌上 dystrophin 蛋白与位于肌膜上的不同蛋白(Sarcoglycans,Dystroglycans,Syntrophins 及 Sarcospan)互相作用形成 DGC (Dystrophin-associated glycoprotein complex)复合体。此复合体在细胞外基质(ECM)和细胞骨架之间形成一个跨膜结构,保护肌纤维和肌膜在长期的反复机械收缩过程中免受损伤和坏死,保持肌膜的完整性。除了起到机械保护和结构支持作用外,它还参与细胞间的信号转导作用[2]。因此,在肌纤维膜上对肌纤维的存活起着特殊的功能。

目前研究认为,骨胳肌 DGC 核心包括 dystrophin,sarcoglycans(α-,β-,γ-,δ-,ε-SG),dystroglycans(α-,β-DG),sarcospan (SSPN) 和 syntrophins(α,β)。此外一些细胞内和细胞外蛋白与 DGC 紧密相连,如一氧化氮合酶(nNOS),dystrobrevin,Caveolin-3 和 laminin-2。在不同的组织 DGC 的成分是不同的,就肌组织而言,α-dystroglycan 是连接 laminin-2(可能通过它的糖链)和 β-dystroglycan 的细胞外蛋白。Laminin 是细胞外基质的一个成分,β-dystroglycan 是跨膜蛋白,在胞内结合于 dystrophin 半胱氨酸富集区和 C-末端前半部分。在 N-末端,dystrophin 结合细胞支架的 F-actin。近来,Yoshida 等发现 dystrobrevin 的 N 末端部参与 sarcoglycan-sarcospan 复合物的联系,并假设 sarcoglycan-sarcospan 复合物通过联有 dystrobrevin 的 α-syntrophin 结合信号蛋白一氧化氮合酶(nNOS)。(见 http://www.dmd.nl/)核心蛋白多糖和二聚糖是小型的细胞外的蛋白聚糖,与细胞因子,基质蛋白特别是胶原有着交互作用[6]。有研究发现核心蛋白多糖和二聚糖在 DMD 患者骨骼肌中增加,至少表明成纤维细胞是导致肌营养不良蛋白聚糖的来源。

4 DMD 基因突变

在 DMD 基因的突变中,约有 30%是新发突变,为非遗传所致。其余的突变以 X-连锁隐性遗传,因此疾病主要影响男性,纵然在罕见的情况下如果女性携带有破坏 DMD 基因的 X-常染色体易位,他们也可能有相似的表现型。

DMD 基因最多见的突变是基因内部的缺失,占总突变类型的 65%~70%。重复突变约 5%~10%,其余的突变则为点突变或微缺失或常规方法检测不出的微小重复约占 30%,通常导致无义突变和移码突变。

缺失几乎可发生于该基因的任何部位,但存在 2 个缺失热区。一个位于基因的中央区域,是最多见的缺失区域,多包括 45~53 号外显子之间的 1 个或多个外显子的缺失。剪去了部分中央棒状区,其 5'端断裂点常位于 44 号内含子内,3'端断裂点多位于 50 号内含子,约占总缺失的 54%~60%;另一个缺失热区位于基因的 5'端,包括 2~20 号外显子之间的 1 个或多个外显子的缺失,剪去了部分或全部肌动蛋白结合位点和部分棒状区域,其断裂点常发生在 1 号或 7 号内含子,也常常会发生在下游的内含子中[6],约占总缺失的 22%~27%。常规用多重 PCR 检测缺失热区中的外显子缺失,能测到占全部各种缺失的 98%。形成缺失热区的原因不甚明了。有人认为与 Xp21 区域染色质的结构有关[7]。近来研究发现缺失接头来源于非同源的末端连接,此为恢复 DNA 双链断裂

维普资讯 http://www.cqvip.com

的主要途径,同时分散的断裂点区域反映了双链断裂的末端处理的可变的程度以及小缺失接头的存在[8]。

重复突变与缺失突变区域存在部分重叠,不同于缺失的分布,我们发现在基因 5'端有 80%的重复,在中央区只有 20%,DMD 患者的框外重复和 BMD 患者的框内重复都表明读码框假说同样支持重复。

与缺失突变不同,点突变没有明显的分布热点,随机地分布于整个基因上。虽然有人预言这种突变能产生适量剪短的蛋白,但通常很少或没有蛋白检测到,表明相应转录物和剪短的蛋白是不稳定的。虽然点突变与缺失,重复所描述的读码框假说存在一致性,但这种类型的突变在抗肌萎缩蛋白的结构/功能关系上提供很少的信息。一些引起严重的氨基酸替代的改变有所报道,这些大多数都是多态性变化。总之,没有引起蛋白截断的突变对抗肌萎缩蛋白的功能能够提供进一步的认识,确定了重要的区域和构象,对抗肌萎缩蛋白的稳定是必要的[9]。

5 基因型与表型的关系:"阅读框理论"

基因缺失的不同位置和范围,直接影响 mRNA 的重组和分子剪接,即影响了外显子的拼接顺序。这种拼接状况决定了临床表型的严重程度。但 dystrophin 基因缺失的范围和临床表型之间不存在简单的因果关系。一般来说,临床表型取决于缺失突变(也适用于重复)是否破坏了翻译阅读框,即 Monaco 等提出的"阅读框理论"所解释。如果缺失后的分子重排产生移码突变(Out-of frame/frame shift),导致整个阅读框发生根本变化,出现新的终止密码,使 dystrophin 蛋白翻译过程提前结束,从而产生一个高度短缩的、没有核心功能区(半胱氨酸富含区和 C 端区)的异常蛋白质,这种异常的蛋白质不具有形成完整细胞骨架的功能,临床表型为 DMD。如果分子重排是以整码形式移位(In-frame),阅读框不变,产生的蛋白仅是长度变化,而主要的功能区域未改变,临床表型则为 BMD。以上阅读框规则适用于 90%以上的病例,并普遍用于肌营养不良症的确诊及 DMD 与 BMD 的鉴别诊断[10]。另外,第 51 号外显子表达的多肽对应于中央杆状区的第 3 铰链区,该区对于维持 dystrophin 蛋白的折叠及弹性状态非常重要,因此第 51 号外显子的单个缺失常导致严重的 DMD 表型[11]。

然而 dystrophin 基因的 5'端和中央缺失热点区域都有一些不符合翻译阅读框规则的特例,一些患者具有 out-of-frame 突变但表型为 BMD 其原因可能是在可变剪接的过程中产生了外显子跳跃(Exon skipping),其蛋白通常保留羧基末端,而仍具有功能。Elhawary 等[12]报道 1 例第 51 号外显子缺失导致明显移码突变的 BMD 病例,可能因其正常拼接位点保守序列改变使缺失两侧某一外显子不参与拼接,导致该患者的阅读框被重建。阅读框被重建可能是由于信息序列中包含内含子,激活了隐藏的拼接位点,或在两侧内含子序列产生一个新的拼接位点。前面提到第 51 号外显子缺失产生移码突变者通常导致严重 DMD 表型,然而在这个区域再缺失一个或多个其它的外显子(例如 45~48 号外显子,48~51 号外显子,45~51 号外显子)产生 BMD 表型,表明更多的缺失纠正了第一个缺失改变的翻译阅读框。第 48 号外显子缺失产生整码突变但导致严重表型的病例也可用选择性拼接来解释,但如果第 48 号外显子两侧的外显子分别编码一个完整数目的氨基酸,在 mRNA 水平上改变任何一侧外显子的拼接位点可能不会破坏翻译阅读框,因此同是第 48 号外显子突变也可观察到温和的 BMD 表型。

另外,有学者报道说,如前所提到由于 utrophin 与 dystrophin 在氨基酸序列上有高度同源性及结构相似性,能够发挥与 dystrophin 相类似的功能。因此在 dystrophin 基因有严重突变,而因 utrophin 的过量表达而表型很轻。

6 DMD 的发病机理

由于不同的转录起始位点和选择性的剪接,mRNA 在不同的组织表达出不同的 dystrophin 蛋白形式。DMD 患者通常无抗肌萎缩蛋白表达或产生无功能的蛋白;而 BMD 患者只有部分抗肌萎缩蛋白产生,但数量减少或分子大小发生改变。无论如何,引起的疾病比单单的基因缺失要复杂的多。研究显示与抗肌萎缩蛋白相互作用的一些糖蛋白在这类疾病中也存在缺失。这样,dystrophin 蛋白缺失可能就是最终导致肌肉萎缩症的第一步。

Dystrophin 是抗肌萎缩蛋白基因(DMD 基因)的产物,当 DMD 基因突变后 Dystrophin 合成缺乏,影响了 DGC 的有效形成,Dystrophin 作为连接肌细胞骨架与细胞外基质的蛋白复合物的一部分,引起分子框架的分裂[7]。这些效应至少造成两种下游后果:第一,细胞膜更加不稳定,在离心性肌肉收缩过程中能造成机械性损坏最终造成肌细胞因通透性增加而变性或坏死,导致 DMD 的发生;第二,膜蛋白质,特别是与机械应激敏感的离子通道失调[13]。在培养的模型鼠肌管内,异常的信号途径效能影响了肌纤维膜对钙的渗透性。通过活化的钙通道增加钙内流在明显的临床症状出现前分离出来模型鼠的肌肉中已经观测到[14]。有关潜在的钙平衡失调机制目前仍有争议。一种可能性说法就是对肌肉的机械应激导致了肌膜营养障碍性损伤,使钙漏电通道活性增加,近来有研究报道 GRC(the Growth factor-regulated channel)是 Ca^{2+} 可渗透的非选择性离子通道,属于 TRP (Transient receptor potential)通道家族,在肌营养不良患者的肌膜中兴奋性提高[15]。引起肌膜对钙的渗透性增加,来自胞外或肌浆网内的钙进入胞内,造成异常钙内流和超负荷[7],然后钙超载致成钙依赖型蛋白酶的活化,促成了肌纤维退化,这种异常的信号级联放大在营养障碍基因缺乏肌肉中通过化学诱导物和炎症介质高表达加速了炎症发应,而此发生在出现明显临床症状之前[16]。另外,有研究认为疾病过程的严重性与对肌肉蛋白的氧化损伤程度和肌肉中 nNOS 活性的下降是相关的[17]。

7 结论与展望

维普资讯 http://www.cqvip.com

DMD 基因大而复杂,存在多种可变剪接方式,而且突变类型多样,对其全面理解尚需要深入研究。对患者做出准确的基因诊断非常重要,联合应用不同的基因检测技术,对 DMD 基因进行全面分析,获得最可靠的信息。近年来,检测 dystrophin 基因突变的新方法不断涌现。Bennett 等的研究表明用变性高效液相色谱(Denaturing high-performance liquid chromatography,DHPLC)检测点突变是非常可行的实验手段,使 dystrophin 基因突变检出率从 65%提高到 92%以上而成本只有中度增长。申本昌[18]等用此方法表明有助于发现外显子、内含子接头序列突变所致的 DMD 患者致病突变的检测。复合连接探针扩增(Multiple ligation probe amplification,MLPA)是检测缺失和重复突变的新方法[19],尤其对受累者致病性突变未知的女性携带者基因突变的筛查有其他方法不可比拟的优势,为遗传咨询提供了非常有用的信息。

目前在基因治疗方面有所进展主要是纠正基因缺陷,修复有功能的 dystrophin 蛋白的表达,减慢疾病进展,改善 DMD 患者生活质量,粗略的包括基因转移,基因修正等替代疗法,生肌细胞的注射,骨髓干细胞移植治疗等等。迄今为止最有前途的疗法就是利用反义寡核苷酸(AONs)诱导外显子跳跃,以修复 dystrophin 转录本的读码框,改变 dystrophin mRNA 从(Out-of-frame)到(In-frame),使 DMD 达到 BMD 的转变[20]。由于这种疾病呈致死的,残酷的进展,因此研究一种有效的治疗方法仍然是最迫切的问题。

然而,预防 Duchenne 肌营养不良最有效的措施莫过于产前诊断,尤其是胚胎植入前遗传学诊断(PGD),这是杜绝患儿出生的有效措施。随着分子生物学技术的发展,可以对 DMD 患者进行精确的致病基因检测的 PGD,检测到女性 DMD 携带者的胚胎和正常男性胚胎,从而减少女性携带者出生,并有望诞生健康男婴。

(通讯作者:柳 青,研究员,博士生导师,重庆医科大学附属第一医院临床研究中心,邮编:400016)

参 考 文 献

[1] Acharvva S,Villalta SA,Bakkar N,et al. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy[J]. J Clin Invest,2007;117(4):889-901.

[2] Chakkalakal JV,Thompson J,Parks R.J.,et al. Molecular,cellular,and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies[J]. FASEB J,2005;19:880-891.

[3] Chamberlain J S. Gene therapy of muscular dystrophy[J]. Hum Mol Genet,2002;11(20):2355-2362.

[4] 陈素秀,曾 谦,蒋亦燕.Utrophin 与 Duchenne 肌营养不良[J].医师进修杂志,2005;28(10):53-54.

[5] Kleopa KA,Drousiotou A,Mavrikiou E,et al. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy[J]. Hum Mol Genet,2006;15(10):1623-1628.

[6] Fadic R,Mezzano V,Alvarez K,et al. Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy:role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease[J]. J Cell Mol,2006;10(3):758-769.

[7] Blake DJ,Weir A,Newey SE,et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle[J]. Physiol Rev,2002;82:291-329.

[8] Sironi M,Pozzoli U,Comi GP,et al. A region in the dystrophin gene major hot spot harbors a cluster of deletion breakpoints and generates double-strand breaks in yeast[J]. FASEB J,2006;20:1287-1295.

[9] Thomas W. Prior,Scott J. Bridgeman. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy[J]. JMD,2005;7(3):317-326.

[10] ZHOU Guangqian,XIE Huiqi,ZHANG Suzhen,et al. Current understanding of dystrophin-related muscular dystrophy and therapeutic challenges ahead [J]. Chinese Medical Journal,2006;119(16):1381-1391.

[11] De Angelis F,Sthandier O,Berarducc B,et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in 48-50 DMD cells[J]. PNAS,2002;99(14):9456-9461.

[12] Elhawary NA,Rabah MS,Nemat H. Frameshift deletion mechanisms in egyptian Duchenne and Becker muscular dystrophy families[J]. Mol and Cells,2004;18(2):141-149.

[13] Kumar A,Khandelwal N, Malya R,et al. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers [J]. FASEB J,2004;18:102-113.

[14] Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, et al. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic(mdx) mouse skeletal muscle fibers[J]. J Cell Biol,2002;158(6):1089-1096.

[15] Iwata Y,Katanosaka Y,Arai Y,et al.A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca^{2+}-permeable growth factor-regulated channel[J]. J Cell Biol,2003;161(5):957-967.

[16] Porter JD,Khanna S,Kaminski HJ,et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice[J]. Hum Mol Genet,2002;11(3):263-272.

[17] Irena Niebr ó j-Dobosz,Irena Hausmanowa-Petrusewicz.The involvement of oxidative stress in determining the severity and progress of pathological processes in dystrophin-deficient muscles [J]. Acta Biochimica Polonica,2005;52(2):449-452.

[18] 申本昌,张 成,陈松林,等.非缺失/重复型 Duchenne 肌营养不良症患者的致病点突变分析[J].中华医学遗传学杂志,2006;23(4):392-396.

[19] Kent K.S, Ivan F.M,Tony M.F,et al. Detecting exon deletions and duplications of the DMD gene using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification(MLPA)[J]. Clinical Biochemistry,2006;39:367-372.

[20] Aartsma-Rus A,Janson A,van Ommen G,et al. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy[J]. BMC,2007;8:43-52.