

Duchenne 型肌营养不良症基因治疗进展与思考

张成 林金福 廖子钰

【摘要】 Duchenne 型肌营养不良症是临床常见的遗传性肌肉病,系肌细胞膜上骨架蛋白抗肌萎缩蛋白(dystrophin)缺失所致,表现为进行性肌无力和肌萎缩并最终死于心力衰竭或呼吸衰竭。目前开展的基因治疗方法可以分为恢复 dystrophin 蛋白表达或补偿 dystrophin 蛋白缺失两种类型,恢复 dystrophin 蛋白表达的方法包括无义突变通读、外显子跳跃、腺相关病毒介导的基因替代和基因编辑治疗。了解 Duchenne 型肌营养不良症基因治疗的最新研究进展、关注恢复 dystrophin 蛋白表达的研究,对选择最佳基因治疗方案将有所裨益。

【关键词】 肌营养不良,杜氏; 基因治疗; 综述

Advance and cogitation of gene therapy for Duchenne muscular dystrophy

ZHANG Cheng, LIN Jin-fu, LIAO Zi-yu

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】 Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the common hereditary muscular disease caused by the deficiency of cytoskeletal protein dystrophin on the sarcolemma. It is characterized by progressive muscle weakness and atrophy and dying of heart or respiratory failure. Currently the gene therapy strategies of DMD can be categorized into two groups: restoring dystrophin expression and compensating for the lack of dystrophin. Therapies restoring dystrophin include nonsense mutation readthrough, exon skipping, adeno-associated virus (AAV) mediated *micro-dystrophin* therapy and gene editing. Here we summarize the latest advance of gene therapy for DMD, focusing on strategies that restore dystrophin, hoping to benefit the choosing of optimal gene therapy.

【Key words】 Muscular dystrophy, Duchenne; Genetic therapy; 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).

Conflicts of interest: none declared

Duchenne 型肌营养不良症(DMD)是X连锁隐性遗传性致死性肌肉病,发病率15.90~21.90/10万新生活产男婴^[1-3],致病基因是定位于染色体Xp21的DMD基因,全长约 2.20×10^6 bp,包含79个外显子,其cDNA长度约 14×10^3 bp,编码抗肌萎缩蛋白

(dystrophin)^[4]。其临床特点表现为儿童期发病、缓慢进展的全身骨骼肌无力和肌萎缩,上楼和蹲起困难,Gowers征阳性,小腿腓肠肌假性肥大、坚实,患儿可于9~12岁丧失行走能力,常伴有心肌损害,于20岁左右死于心力衰竭或呼吸衰竭。目前的标准治疗方法是以糖皮质激素和血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)等药物为主,同时辅以护理、营养支持、康复训练和晚期呼吸支持等多学科管理的原则,可使患者预期寿命延长至30~40岁^[5]。近年来,基因治疗的进展为该病的病因治疗带来希望,本文重点介绍目前应用于临床的无义突变通读治疗、外显子跳跃治疗、腺相关病毒(AAV)介导的基

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.05.004

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

因替代治疗和成簇的规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR)/Cas9 系统基因编辑治疗的最新研究进展,包括各种基因治疗方法的研究对象、给药途径、治疗效果、不良反应、各种基因药物的优缺点,以及笔者选择基因药物的一些观点。

一、无义突变通读治疗

无义突变可致信使 RNA(mRNA)提前出现终止密码子,使肽链合成中断,形成截短 dystrophin 蛋白甚至蛋白质合成障碍。无义突变约占所有 DMD 基因突变类型的 10%^[6],而无义突变通读治疗则是针对此类突变极具前景的治疗方法之一,目前已取得了突破性进展。1979 年,Spithill 等^[7]发现氨基糖苷类抗生素可以抑制酵母细胞无义突变导致的表型,通过诱导对提前出现的终止密码子的通读,从而抑制无义突变引起的翻译异常终止,恢复全长 dystrophin 蛋白的表达。1999 年,Barton-Davis 等^[8]在动物实验中证实了氨基糖苷类抗生素对无义突变通读治疗的作用,即经皮下注射庆大霉素 2 周后,Duchenne 型肌营养不良症模型 mdx 小鼠胫骨前肌 dystrophin 蛋白水平最高可达正常参考值的 20%,且由肌肉收缩诱导的损害症状明显改善。至 2010 年,无义突变通读治疗正式进入临床试验,Malik 等^[9]采用三种治疗方案观察经静脉注射庆大霉素对 Duchenne 型肌营养不良症患者(包括 26 例无义突变和 8 例移码突变)的疗效,观察时间 6 个月,其中,方案一:7.50 mg/(kg·d)持续治疗 2 周(10 例无义突变和 8 例移码突变);方案二:7.50 mg/kg(1 次/周)连续治疗 6 个月(12 例无义突变);方案三:予 7.50 mg/kg(2 次/周)持续治疗 6 个月(4 例无义突变),其结果显示,26 例无义突变患儿中 24 例血清肌酸激酶(CK)水平不同程度降低,接受方案二和方案三治疗的 16 例无义突变患儿肌肉 dystrophin 蛋白表达水平显著升高,最高可达 13%~15%,但三种治疗方案均未达到改善肌力的预期目的。氨基糖苷类抗生素具有耳毒性和肾毒性,尤其是高剂量时,这些不良反应和对抗生素应用的管制可能限制了此类药物的临床应用。目前,日本正在开展硫酸阿贝卡星(NPC-14)的 II 期临床试验(试验编号:NCT01918384),期待能够获得预期疗效和安全性。

PTC124(Ataluren)是目前研究较多的无义突变通读治疗药物,为一种口服药物,最初经高通量药物筛选鉴定并由美国 PTC Therapeutics 公司研发获得^[10],可通过与核糖体亚基的结合,干扰其对提前

出现的终止密码子的识别,进而产生全长 dystrophin 蛋白。尽管,2013 年美国费城儿童医院开展的开放性序贯剂量 II a 期临床试验未能获得 PTC124 具有改善 Duchenne 型肌营养不良症患者肌力和功能的有效证据,但肌肉组织活检显示,其中 61% 的患儿 dystrophin 蛋白表达水平上调且未发生严重不良反应,证实该药安全、有效^[11]。2014 年,一项以 Duchenne 型肌营养不良症患者作为观察对象的随机双盲安慰剂对照 II b 期临床试验,将 174 例符合纳入标准的患儿分为 PTC124 低剂量组(早、中、晚各 10、10、20 mg/kg,57 例)、中剂量组(早、中、晚各 20、20、40 mg/kg,60 例)以及安慰剂组(57 例),分别观察 6 分钟步行试验(6MWT)步行距离(主要终点事件)和定时功能测验(次要终点事件),连续治疗 48 周后,PTC124 组(低剂量组和中剂量组)与安慰剂组主要终点事件差异未达到统计学意义,但是低剂量组次要终点事件结果优于安慰剂组^[12]。最近报道的一项随机双盲安慰剂对照 III 期临床试验共纳入来自 180 个国家的 228 例患儿,连续治疗 48 周后,PTC124 组(40 mg/kg)与安慰剂组患儿 6MWT 试验步行距离差异仍未达到统计学意义,仅在基线 6MWT 试验步行距离为 300~400 m 的亚组中,PTC124 组步行距离和定时功能测验结果优于安慰剂组;而在其他两个基线 6MWT 试验步行距离 < 300 m 和 ≥ 400 m 的亚组中未观察到此疗效^[13]。由于 PTC124 的 II b 期和 III 期临床试验主要终点事件不甚理想,目前美国食品与药品管理局(FDA)拒绝批准其上市。然而,该药在延缓疾病进程方面确有疗效,因此,欧洲药物管理局(EMA)于 2014 年批准其有条件上市,目前多项有关 PTC124 的 III 期临床试验(试验编号:NCT01247207, NCT01557400, NCT02090959, NCT03179631)正在进行中,其研究结果值得期待。随着高通量药物筛选鉴定方法的优化,越来越多的非氨基糖苷类、具有无义突变通读活性的药物及其衍生物逐渐被发现,目前仍处于细胞和动物实验阶段^[14-15]。国内有 2 例无义突变的 Duchenne 型肌营养不良症患儿在德国接受 3 个月的 PTC124(早、中、晚各 250、250、625 mg)口服治疗,回国后继续服用药物 3 年,经中山大学附属第一医院对其平地行走和上楼能力进行观察,发现 2 例患儿运动功能优于无义突变的同龄患儿,其中 1 例已 13 岁仍能站立并在扶持下行走,其疗效和安全性目前仍在观察和评估中(未发表)。为了能够更加全

面地评价 PTC124 的疗效,未来应采取更佳临床评价指标和更长期的临床试验。

二、外显子跳跃治疗

DMD 基因突变可以导致 Duchenne 型肌营养不良症或 Becker 型肌营养不良症(BMD),后者临床症状轻微,预后相对较好。阅读框假说认为,Duchenne 型肌营养不良症系 DMD 基因移码突变所致,其生成的 mRNA 不能编码具有功能的 dystrophin 蛋白;Becker 型肌营养不良症系 DMD 基因整码突变引起,故不导致 mRNA 阅读框改变^[16]。因此,通过反义寡核苷酸(ASO)靶向跳过发生移码突变的特定外显子,调节前信使 RNA(pre-mRNA)剪接过程并恢复 mRNA 阅读框,进而产生缩短但仍有部分功能的 dystrophin 蛋白,有望将 Duchenne 型肌营养不良症转变为 Becker 型肌营养不良症。理论上,1 个和 2 个外显子跳跃可以治疗 DMD 基因中 79% 的缺失突变、91% 的微小突变和 73% 的重复突变,三者约占所有 DMD 基因突变类型的 83%^[17]。由于 DMD 基因突变热点位于外显子 45~55,因此针对外显子 51 和 53 的跳跃治疗分别适用于高达 14% 和 10.1% 的 Duchenne 型肌营养不良症患者,其中,针对外显子 51 的跳跃治疗是适用比例最高的跳跃治疗方法,例如外显子 45~50、48~50、50 和 52 缺失均为其适应证范围^[17-18],这也是最早开展临床试验的外显子跳跃治疗方法,目前已在 Duchenne 型肌营养不良症小鼠和犬模型上显示出良好的疗效^[19-21]。最早进入临床试验阶段的外显子 51 跳跃治疗药物是 Drisapersen 和 Eteplirsen,二者化学成分不同,Drisapersen 的主要成分是 2'-O-甲基-硫代磷酸酯寡核苷酸(2'OMePS),Eteplirsen 是磷酸二胺吗啉代寡聚物(PMO)。

在已公布的 Drisapersen 相关临床试验中,对 300 余例 Duchenne 型肌营养不良症患者的疗效进行观察,经皮下注射给药,剂量 6 mg/(kg·周)^[22-25]。其中,两项小样本安慰剂对照临床试验显示,与安慰剂组相比,Drisapersen 可使年龄较小的 Duchenne 型肌营养不良症患者(6~8 岁)6MWT 试验步行距离延长,但组间差异无统计学意义^[24-25]。最近开展的一项针对 5 岁以上 Duchenne 型肌营养不良症患者的 III 期临床试验共纳入 186 例病例,试验结束时 Drisapersen 组与安慰剂组之间的主要终点事件(6MWT 试验步行距离)和次要终点事件[包括北极星移动评价量表(NSAA)、爬 4 级楼梯速度和 10 米

步行试验(10MWT)]差异无统计学意义^[26],且 Drisapersen 组患儿治疗后均出现明显的肾功能损害和注射部位炎症反应^[27]。鉴于 Drisapersen 相关临床试验未能达到预期疗效且安全性堪忧,美国食品与药品管理局拒绝批准其上市。

Eteplirsen 的治疗剂量为 30 或 50 mg/kg 静脉注射,2011 年的一项随机双盲安慰剂对照临床试验已证实其安全性良好,但临床疗效不甚明显。该试验以 12 例 Duchenne 型肌营养不良症患者为受试对象,经 Eteplirsen 连续治疗 48 周后,患儿 dystrophin 蛋白阳性肌纤维比例增至 30%~50%,但至 188 周后,Western blotting 法显示与基线(0.08%)相比,患儿 dystrophin 蛋白平均水平仅增至 0.94%^[28];经过为期 3 年随访,Eteplirsen 组患儿 6MWT 试验步行距离的减少较自然病程缓慢,且未发现药物相关不良反应^[29]。尽管,dystrophin 蛋白小幅度升高的临床获益意见不尽一致,美国食品与药品管理局仍于 2016 年有条件地批准 Eteplirsen 用于治疗 Duchenne 型肌营养不良症,但强制要求美国 Sarepta Therapeutics 公司在药物上市后须进行验证性研究以证实其疗效,并于 2021 年前报告研究结果。Eteplirsen 的 III 期临床试验(试验编号:NCT02255552)于 2014 年开始,目前尚未公布结果。

2007 和 2010 年进行的细胞和动物实验结果显示,肽缀合的吗啉代寡聚物(PPMO)较 PMO 具有更强的稳定性和细胞内转导效率^[30-31],有望进一步提高治疗效果,目前用于外显子 51 跳跃治疗的 PPMO 正在进行 I 期临床试验(试验编号:NCT03675126)。针对其他靶点的外显子跳跃药物的临床试验也在进行中,其中,外显子 53 跳跃治疗适用于外显子 45~52、48~52、49~52、50~52 和 52 缺失^[32]。2018 年的一项开放性剂量递增 I 期临床试验验证了 NS-065/NCNP-01(日本新药株式会社)的安全性及其诱导 mRNA 外显子 53 跳跃的能力^[33];同年开展的病理学研究表明,Golodirsen(美国 Sarepta Therapeutics 公司)可以诱导外显子 53 跳跃并显著上调 dystrophin 蛋白表达水平^[34],目前正在 III 期临床试验(试验编号:NCT02500381, NCT03532542)。此外,外显子 45 跳跃治疗药物 Casimersen(试验编号:NCT02500381, NCT03532542)、DS-5141b(试验编号:NCT02667483),以及外显子 51 跳跃治疗的立体纯硫代磷酸反义寡核苷酸 WVE-210201(试验编号:

NCT03508947)亦处于临床试验阶段。

三、腺相关病毒介导的微小基因替代治疗

将外源性功能基因转染至靶组织以替代突变基因是目前颇具前景的治疗方法,理论上适用于各种突变类型的 Duchenne 型肌营养不良症。由于 *DMD* 基因及其 cDNA 长度过长,完整基因的转染需依靠大型病毒如腺相关病毒,然而,由于腺相关病毒介导的基因替代治疗临床试验中发生的死亡事件(1例),引起对腺相关病毒作为载体的安全性质疑^[35]。研究显示,腺相关病毒载体安全性良好,是目前常用的基因转染载体,无法在细胞内自我复制,无已知的致病性^[36]。进一步的动物实验证实其免疫原性较低,腺相关病毒介导的目的基因可导入非分裂细胞并长期表达^[37-38],但腺相关病毒载体容量较小,仅能运载长度约 5×10^3 bp 的目的基因^[39]。England 等^[40]曾报告 1 例症状轻微的 Becker 型肌营养不良症患者,尽管缺失的蛋白质序列超过 46%,但该例患者至 61 岁时仍能独立行走,表明 *DMD* 基因的较大缺失也可能仅表现为轻微的临床表型。至此,基因治疗策略逐渐转向优化微小基因,即微小抗肌萎缩蛋白(*micro-dystrophin*)基因。*DMD* 基因缺失超过 36 个外显子的患儿均呈现严重的临床表型^[41],在保留 *DMD* 基因与细胞骨架蛋白 γ -肌动蛋白相连接的氨基末端(N末端)、与抗肌萎缩糖蛋白(*dystroglycan*)结合的富含半胱氨酸区(CR区)等重要结构域的基础上^[42],*micro-dystrophin* 基因不断优化,迄今已报道超过 30 种构型^[43]。

腺相关病毒载体可以全身系统给药且广泛转染至骨骼肌和心肌,不同血清型对组织的转染能力各异,其中 AAV9 可更好地转染至心肌细胞^[44-46]。采用 rAAV6 *micro-dystrophin* 基因替代治疗 *dystrophin-utrophin* 双敲除的 Duchenne 型肌营养不良症模型小鼠,发现因收缩诱导的肌肉损害和核中心移位纤维(CNF)比例明显下降,心肌、膈肌和胫骨前肌 *dystrophin* 蛋白升高,肌力和运动功能改善,存活期延长^[47]。2006 年进行的一项随机双盲 I 期临床试验,采用肱二头肌局部注射运载有巨细胞病毒(CMV)启动子的 AAV2 *micro-dystrophin* 基因的方法治疗 6 例 Duchenne 型肌营养不良患儿,注射后第 42 和 90 天肌肉组织活检显示,仅 2 例肌肉组织中存在少量 *dystrophin* 蛋白阳性纤维,4 例检测到针对 *micro-dystrophin* 基因蛋白产物、回复纤维或腺相关病毒衣壳蛋白的 T 细胞免疫反应,其中 1 例试验前

即检测到针对回复纤维的 T 细胞免疫应答,提示针对外源性 *micro-dystrophin* 基因蛋白产物、内源性回复纤维 *dystrophin* 蛋白阳性和腺相关病毒衣壳蛋白的 T 细胞免疫应答可能对治疗产生不利影响^[48]。由于 Duchenne 型肌营养不良症广泛累及全身肌肉组织,包括心肌和呼吸肌,因此局部治疗并不能改善最终预后,系统性给药的治疗研究尤为重要。腺相关病毒治疗前结合适当免疫抑制剂治疗,可使 AAV *micro-dystrophin* 基因在肌肉组织中长期持续表达^[49-50]。最新的动物实验在末行免疫抑制治疗情况下,静脉注射 rAAV2/8-Spc5.12 *micro-dystrophin* 基因治疗 Duchenne 型肌营养不良症模型犬,观察 2 年发现,模型犬骨骼肌和心肌 *dystrophin* 蛋白表达水平显著升高,肌肉组织形态、肌力和临床表型呈持续改善,未检测到相关的免疫反应^[51]。

由于腺相关病毒介导的微小基因替代治疗的动物实验(犬模型)取得了较好的效果,经美国食品与药品管理局批准,目前有 4 项临床试验正在美国进行:SGT-001(试验编号:NCT03368742)处于 I 和 II 期临床试验阶段,2017 年启动,采取 AAV9 和肌肉特异性启动子单次静脉注射,主要终点事件是根据肌肉组织活检评价 *micro-dystrophin* 蛋白表达水平,预计至 2021 年结束;PF-06939926(试验编号:NCT03362502)处于 I 期临床试验阶段,2018 年启动,采取 AAV9 和肌肉特异性启动子单次静脉注射,主要终点事件是评价药物安全性和耐受性,预计至 2024 年结束;rAAVrh74-MCK-GALGT2(试验编号:NCT03333590)处于 I 和 II 期临床试验阶段,于 2017 年启动,单次经动脉注射,其主要终点事件是评价药物安全性,预计至 2020 年试验结束;rAAVrh74-MHCK7 *micro-dystrophin*(试验编号:NCT03375164)处于 I 期临床试验阶段,2017 年启动,单次静脉注射,主要终点事件是评价药物安全性,预计至 2021 年结束。AAV *micro-dystrophin* 基因替代治疗,理论上适用于所有突变类型 Duchenne 型肌营养不良症。由于治疗后外源性基因的表达持续时间尚不明确,有可能需要重复给药,而机体对腺相关病毒衣壳蛋白的 T 细胞免疫反应而影响再次给药,未来通过使用替代性血清型腺相关病毒、免疫调节或血浆置换(PE)等治疗方法希望可以解决这一问题。由于上述研究是开放性临床试验,从现有疗效看,经单次静脉注射后部分患儿运动功能明显改善,其远期疗效和药物不良反应是目前关注的

热点。

四、基因编辑治疗

CRISPR/Cas9 系统是继大范围核酸酶、锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶后,操作更简便、效率更高、成本更低、应用范围更为广泛的基因编辑工具。在细菌基因组中,CRISPR 序列用于识别外源性 DNA 序列,CRISPR 相关基因(*Cas*)表达产物可以切断外源性基因^[52]。基因编辑技术运用这种细菌免疫机制,将内切酶与向导核糖核酸(gRNA)相连接,通过病毒或非病毒载体导入细胞内,实现 DNA 精准识别、切割,并根据 DNA 模板产生同源重组(HDR)或非同源末端连接(NHEJ),进而修复 DNA 链^[53]。目前应用于 *DMD* 基因编辑的内切酶,包括金黄色葡萄球菌来源的 SaCas9、化脓性链球菌来源的 SpCas9 和 Cpf1;体外研究载体包括质粒、慢病毒、腺病毒,体内研究多为腺相关病毒载体。

DMD 基因剪接在鼠和人类的保守性使其从动物实验推断人类疾病成为可能。自 2016 年开始,CRISPR/Cas 系统逐渐在体外培养的肌卫星细胞、Duchenne 型肌营养不良症患者诱导型多能干细胞(iPSCs)、*DMD* 基因缺陷小鼠中实现 *DMD* 基因编辑,并可见 dystrophin 蛋白水平恢复,部分骨骼肌和心肌肌力增强^[54-57]。目前,观察时间最长的动物实验是 Hakim 等^[58]进行的 6 周龄 mdx 小鼠模型研究,经 mdx 小鼠尾静脉注射 AAV9 *CRISPR/SaCas9* 基因,18 个月后观察到 mdx 小鼠体内 dystrophin 蛋白水平升高,最高可达 20%,肌力和心功能增强。对携带突变基因的胚胎进行基因编辑是避免形成突变嵌合体的关键,此外,AAV *CRISPR-SaCas9* 基因可以使成年小鼠产生体液免疫和细胞免疫,降低基因编辑效率,对新生小鼠(出生后 1~18 天)即进行基因编辑可以有效减轻免疫应答^[59]。

大型哺乳动物模型是从小鼠模型跨越至人类患者的桥梁。deltaE50-MD(Δ Ex50)犬模型是 *DMD* 基因内含子 50 发生错义突变,自发跳跃外显子 50,导致阅读框移码,其病程进展、严重程度较 mdx 小鼠更接近人类患者^[60]。2018 年,Amoasii 等^[61]首次实现对 Duchenne 型肌营养不良症犬模型进行基因编辑:于 1 月龄 Δ Ex50 模型犬肌肉注射(2 只)或静脉注射(2 只)AAV9 *CRISPR-Cas9* 基因和靶点为外显子 51 剪接受体位点的 sgRNA-51,肌肉注射 6 周和静脉注射 8 周后,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)显示外显子 49 剪接至外显子 52,恢复正常阅读框;免

疫组织化学染色、蛋白电泳检测,dystrophin 蛋白在模型犬心肌和膈肌的表达水平明显升高。该实验具有基因编辑从动物模型向临床治疗过渡的里程碑意义;然而,由于样本量较小、持续时间较短,以至于未观察到长期治疗效果和潜在的免疫反应,而且存在模型犬年龄对应人类患者年龄较小、观察指标不完善等局限性^[62-63]。

虽然,基因编辑治疗目前尚处于细胞和动物实验阶段,但已展现出诱人的前景,该治疗方法旨在恢复有功能的 dystrophin 蛋白的表达水平,增强肌力,以期提高运动功能、呼吸功能和心功能等。低水平的 dystrophin 蛋白表达恢复仍可以增强 Duchenne 型肌营养不良症小鼠肌力。由于反义寡核苷酸介导的外显子跳跃治疗的作用靶点为 *DMD* mRNA,不能产生持久性疗效,故患者需定期给药;基因编辑虽可产生持久性疗效,但仍存在脱靶问题,若发生安全问题,这种持久性改变将会使治疗造成的影响难以终止,同时尚存在病毒载体的安全性和免疫反应问题。

五、展望与思考

目前,无义突变通读治疗药物 PTC124 和外显子 51 跳跃治疗药物 Eteplirsen 已经美国食品药品监督管理局批准有条件上市,从已公布的临床试验结果可以看出,二者虽有疗效但并不显著,且仅适用于特定类型的突变患者。随着对外显子跳跃治疗药物的研发,越来越多的患者可从新药中获益。然而,目前面临的困难是每一个特定外显子跳跃仅适用一小部分患者,使得临床试验招募困难,单药研发成本增加,不仅临床试验开展更加艰难,且由于上市药物价格昂贵,少有家庭能够承担终身用药的经济负担。目前正在开展的 *micro-dystrophin* 基因替代治疗 I 和 II 期临床试验虽不能确定其基因表达的持续时间,但动物实验显示,2 年后仍可维持显著效果,有望为其他不适用无义突变通读和外显子跳跃治疗的患者带来希望。同时,CRISPR/Cas9 系统基因编辑等新兴治疗方法也有巨大的临床潜力,其动物实验业已取得令人鼓舞的结果,但脱靶率和道德伦理等问题尚未解决,未来的研究将致力于降低脱靶率、提高打靶率,为 Duchenne 型肌营养不良症的治疗提供更好的选择。

众所周知,最好的治疗药物须具备疗效显著、安全、单次给药等条件。上述基因疗法是研究者根据当时的研究手段对不同突变类型的 Duchenne 型

肌营养不良症进行的具有针对性的治疗方法,通常仅选择一种基因治疗方法。如果选择对各种类型突变通用的 AAV *micro-dystrophin* 基因替代治疗,是否影响另两种治疗方法在临床的应用尚未可知。然而,AAV *micro-dystrophin* 基因替代治疗并非最佳方案。这是由于腺相关病毒仅运载 *micro-dystrophin* 基因,而非全长 *DMD* 基因,仍存在 *DMD* 基因缺陷,故该治疗方案也仅仅是将 Duchenne 型转变为 Becker 型。AAV *micro-dystrophin* 基因替代治疗目前尚在临床试验中,虽然研究结果令人鼓舞,但长期疗效和安全性尚待进一步观察。因此,更好的治疗是基因编辑治疗,将突变位点的碱基剪掉,接上正确碱基,使其恢复 *DMD* 基因正常碱基序列,编码正常氨基酸,构成正常 dystrophin 蛋白,但是此项方案距离临床试验阶段还有很长的路要走。由于 Duchenne 型肌营养不良症为进行性加重性疾病,当患儿肌萎缩程度尚不十分严重、尚可独立行走时进行基因治疗,无疑获益更大。因此,临床医师、患者及其家属均应关注 Duchenne 型肌营养不良症基因治疗的研究进展,根据患儿具体情况选择最佳基因治疗方案。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Moat SJ, Bradley DM, Salmon R, Clarke A, Hartley L. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK)[J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21:1049-1053.
- [2] Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, Flanigan KM, Al-Dahhak R, Gastier-Foster J, Kneile K, Dunn DM, Duval B, Aoyagi A, Hamil C, Mahmoud M, Roush K, Bird L, Rankin C, Lilly H, Street N, Chandrasekar R, Weiss RB. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2012, 71:304-313.
- [3] Ryder S, Leadley RM, Armstrong N, Westwood M, de Kock S, Butt T, Jain M, Kleijnen J. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review[J]. *Orp J Rare Dis*, 2017, 12:79.
- [4] Chamberlain JR, Chamberlain JS. Progress toward gene therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Mol Ther*, 2017, 25:1125-1131.
- [5] Ishikawa Y, Miura T, Ishikawa Y, Aoyagi T, Ogata H, Hamada S, Minami R. Duchenne muscular dystrophy: survival by cardio-respiratory interventions[J]. *Neuromuscul Disord*, 2011, 21:47-51.
- [6] Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guerguelcheva V, Chan S, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barisic N, Brabec P, Lahdetie J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, Kimura E, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakovska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J, Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannot PY, Joncourt F, Diaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloglu H, El SR, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL, Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuur J, Aartsma-Rus A, Beroud C, Lochmuller H. The TREAT-NMD DMD global database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations[J]. *Hum Mut*, 2015, 36:395-402.
- [7] Spithill TW, Nagley P, Linnane AW. Biogenesis of mitochondria 51: biochemical characterization of a mitochondrial mutation in *Saccharomyces cerevisiae* affecting the mitochondrial ribosome by conferring resistance to aminoglycoside antibiotics[J]. *Mol Gen Genet*, 1979, 173:159-170.
- [8] Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104:375-381.
- [9] Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, Al-Dahhak R, Lewis S, Shilling CJ, Kota J, Serrano-Munuera C, Hayes J, Mahan JD, Campbell KJ, Banwell B, Dasouki M, Watts V, Sivakumar K, Bien-Willner R, Flanigan KM, Sahenk Z, Barohn RJ, Walker CM, Mendell JR. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2010, 67:771-780.
- [10] Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations[J]. *Nature*, 2007, 447: 87-91.
- [11] Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, Bonnemann C, Sampson J, Sweeney HL, Reha A, Northcutt VJ, Elfring G, Barth J, Peltz SW. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy[J]. *PLoS One*, 2013, 8:E81302.
- [12] Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, Connolly AM, Day JW, Flanigan KM, Goemans N, Jones KJ, Mercuri E, Quinlivan R, Renfroe JB, Russman B, Ryan MM, Tulinius M, Voit T, Moore SA, Lee SH, Abresch RT, Coleman KL, Eagle M, Florence J, Gappmaier E, Glanzman AM, Henricson E, Barth J, Elfring GL, Reha A, Spiegel RJ, O'Donnell MW, Peltz SW, McDonald CM; PTC124-GD-007-DMD STUDY GROUP. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy[J]. *Muscle Nerve*, 2014, 50:477-487.
- [13] McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, Finkel RS, Flanigan KM, Goemans N, Heydemann P, Kaminska A, Kirschner J, Muntoni F, Osorio AN, Schara U, Sejersen T, Shieh PB, Sweeney HL, Topaloglu H, Tulinius M, Vilchez JJ, Voit T, Wong B, Elfring G, Kroger H, Luo X, McIntosh J, Ong T, Riebling P, Souza M, Spiegel RJ, Peltz SW, Mercuri E; Clinical Evaluator Training Group, ACT DMD Study Group. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2017, 390:1489-1498.
- [14] Kayali R, Ku JM, Khitrov G, Jung ME, Prikhodko O, Bertoni C. Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21:

- 4007-4020.
- [15] Pibiri I, Lentini L, Tutone M, Melfi R, Pace A, Di Leonardo A. Exploring the readthrough of nonsense mutations by non-acidic ataluren analogues selected by ligand-based virtual screening [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 122:429-435.
- [16] Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, de la Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Recan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gailati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen JD, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Wrogemann K, Blonden LA, van Paassen MB, van Ommen GJ, Kunkel LM. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion[J]. *Am J Hum Genet*, 1989, 45:498-506.
- [17] Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations[J]. *Hum Mut*, 2009, 30:293-299.
- [18] Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87:104-107.
- [19] Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, Yokota T, Yin H, Alter J, Jadoon A, Bou-Gharios G, Partridge T. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:198-203.
- [20] Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S. In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse[J]. *Mol Ther*, 2010, 18:1995-2005.
- [21] Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, Takeda S, Hoffman E. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65:667-676.
- [22] Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, Guglieri M, Ashton E, Abbs S, Nihoyannopoulos P, Garralda ME, Rutherford M, McCulley C, Popplewell L, Graham IR, Dickson G, Wood MJ, Wells DJ, Wilton SD, Kole R, Straub V, Bushby K, Sewry C, Morgan JE, Muntoni F. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8:918-928.
- [23] Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhart PF, Heuvelmans N, Holling T, Jansen AA, Platenburg GJ, Sipkens JA, Sitsen JM, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, Buyse G, Darin N, Verschuuren JJ, Campion GV, de Kimpe SJ, van Deutekom JC. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364:1513-1522.
- [24] Voit T, Topaloglu H, Straub V, Muntoni F, Deconinck N, Campion G, De Kimpe SJ, Eagle M, Guglieri M, Hood S, Liefgaard L, Loubakos A, Morgan A, Nakielyny J, Quarcoo N, Ricotti V, Rolfe K, Servais L, Wardell C, Wilson R, Wright P, Kraus JE. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13:987-996.
- [25] Goemans NM, Tulinius M, van den Hauwe M, Kroksmark AK, Buyse G, Wilson RJ, van Deutekom JC, de Kimpe SJ, Loubakos A, Campion G. Long-term efficacy, safety, and pharmacokinetics of drisapersen in Duchenne muscular dystrophy: results from an open-label extension study[J]. *PLoS One*, 2016, 11:E161955.
- [26] Goemans N, Mercuri E, Belousova E, Komaki H, Dubrovsky A, McDonald CM, Kraus JE, Loubakos A, Lin Z, Campion G, Wang SX, Campbell C; DEMAND III study group. A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy [J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28:4-15.
- [27] Shimizu M, Motohashi Y, Murakami T, Kimura E, Komaki H, Watanabe N. Exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2018, 13:93.
- [28] Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, Alfano L, Gomez AM, Lewis S, Kota J, Malik V, Shontz K, Walker CM, Flanigan KM, Corridore M, Kean JR, Allen HD, Shilling C, Melia KR, Sazani P, Saoud JB, Kaye EM; Eteplirsen Study Group. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2013, 74:637-647.
- [29] Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Shao J, Kaye EM, Mercuri E; Eteplirsen Study Group and Telethon Foundation DMD Italian Network. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Ann Neurol*, 2016, 79:257-271.
- [30] Wu RP, Youngblood DS, Hassinger JN, Lovejoy CE, Nelson MH, Iversen PL, Moulton HM. Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity[J]. *Nucl Acids Res*, 2007, 35:5182-5191.
- [31] Moulton HM, Moulton JD. Morpholinos and their peptide conjugates: therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798:2296-2303.
- [32] Servais L, Montus M, Guiner CL, Ben YR, Anoussamy M, Moraux A, Hogrel JY, Seferian AM, Zehrouni K, Le Moing AG, Gidaro T, Vanhulle C, Laugel V, Butoianu N, Cuisset JM, Sabouraud P, Cances C, Klein A, Leturcq F, Moullier P, Voit T. Non-ambulant Duchenne patients theoretically treatable by exon 53 skipping have severe phenotype [J]. *J Neuromuscul Dis*, 2015, 2:269-279.
- [33] Komaki H, Nagata T, Saito T, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, Tachimori H, Nakamura H, Aoki Y, Takeda S. Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10:437.
- [34] Muntoni F, Frank DE, Morgan J, Domingos J, Schnell FJ, Dickson G, Popplewell L, Guglieri M, Seferian A, Monforte M, Mercuri E, Servais L, Straub V. Golodirsén induces exon skipping leading to sarcolemmal dystrophin expression in patients with mutations amenable to exon 53 skipping [J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28 Suppl 1:5.
- [35] Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13:3-13.
- [36] Berns KL, Linden RM. The cryptic life style of adeno-associated virus[J]. *Bioessays*, 1995, 17:237-245.
- [37] Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:13714-13719.
- [38] Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector[J]. *J Virol*, 1996, 70:8098-8108.
- [39] Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW,

- Phelps SF, Harper HA, Robinson AS, Engelhardt JF, Brooks SV, Chamberlain JS. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2002, 8:253-261.
- [40] England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin[J]. *Nature*, 1990, 343:180-182.
- [41] Fanin M, Freda MP, Vitiello L, Danieli GA, Pegoraro E, Angelini C. Duchenne phenotype with in-frame deletion removing major portion of dystrophin rod: threshold effect for deletion size[J]? *Muscle Nerve*, 1996, 19:1154-1160.
- [42] Duan D. From the smallest virus to the biggest gene: marching towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Discov Med*, 2006, 6:103-108.
- [43] Duan D. Systemic AAV micro-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Mol Ther*, 2018, 26:2337-2356.
- [44] Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23:321-328.
- [45] Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors [J]. *Nat Med*, 2004, 10:828-834.
- [46] Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8[J]. *Mol Ther*, 2006, 14:45-53.
- [47] Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, Finn E, Adams ME, Froehner SC, Murry CE, Chamberlain JS. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice [J]. *Nat Med*, 2006, 12:787-789.
- [48] Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Shilling C, Lewis S, Bowles D, Gray S, Li C, Galloway G, Malik V, Coley B, Clark KR, Li J, Xiao X, Samulski J, McPhee SW, Samulski RJ, Walker CM. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363:1429-1437.
- [49] Shin JH, Yue Y, Srivastava A, Smith B, Lai Y, Duan D. A simplified immune suppression scheme leads to persistent microdystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23:202-209.
- [50] Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, Blankinship M, Gregorevic P, Chamberlain JS, Tapscott SJ, Storb R. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression [J]. *Mol Ther*, 2007, 15:1160-1166.
- [51] Le Guiner C, Servais L, Montus M, Larcher T, Fraysse B, Moullec S, Allais M, Francois V, Dutilleul M, Malerba A, Koo T, Thibaut JL, Matot B, Devaux M, Le Duff J, Deschamps JY, Barthelemy I, Blot S, Testault I, Wahbi K, Ederhy S, Martin S, Veron P, Georger C, Athanasopoulos T, Masurier C, Mingozzi F, Carlier P, Gjata B, Hogrel JY, Adjali O, Mavilio F, Voit T, Moullier P, Dickson G. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:16105.
- [52] Heler R, Marraffini LA, Bikard D. Adapting to new threats: the generation of memory by CRISPR-Cas immune systems[J]. *Mol Microbiol*, 2014, 93:1-9.
- [53] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms [J]. *Ann Rev Biophys*, 2017, 46:505-529.
- [54] Bengtsson NE, Hall JK, Odom GL, Phelps MP, Andrus CR, Hawkins RD, Hauschka SD, Chamberlain JR, Chamberlain JS. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14454.
- [55] Zhang Y, Long C, Li H, McAnally JR, Baskin KK, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice[J]. *Sci Adv*, 2017, 3:E1602814.
- [56] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Castellanos RR, Madhavan S, Pan X, Ran FA, Yan WX, Asokan A, Zhang F, Duan D, Gersbach CA. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2016, 351:403-407.
- [57] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, Maesner C, Wu EY, Xiao R, Ran FA, Cong L, Zhang F, Vandenberghe LH, Church GM, Wagers AJ. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells[J]. *Science*, 2016, 351:407-411.
- [58] Hakim CH, Wasala NB, Nelson CE, Wasala LP, Yue Y, Louderman JA, Lessa TB, Dai A, Zhang K, Jenkins GJ, Nance ME, Pan X, Kodippili K, Yang NN, Chen SJ, Gersbach CA, Duan D. AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice [J]. *JCI Insight*, 2018, 3:E124297.
- [59] Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, Oliver ML, Waller MA, Bohning JD, Robinson-Hamm JN, Bulaklak K, Castellanos RR, Collier JH, Asokan A, Gersbach CA. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2019, 25:427-432.
- [60] Hildyard J, Taylor-Brown F, Massey C, Wells DJ, Piercy RJ. Determination of qPCR reference genes suitable for normalizing gene expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2018, 5:177-191.
- [61] Amoasii L, Hildyard J, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, Harron R, Stathopoulou TR, Massey C, Shelton JM, Bassel-Duby R, Piercy RJ, Olson EN. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Science*, 2018, 362:86-91.
- [62] Lim K, Yoon C, Yokota T. Applications of CRISPR/Cas9 for the treatment of Duchenne muscular dystrophy [J]. *J Pers Med*, 2018, 8:E38.
- [63] Wasala NB, Hakim CH, Chen SJ, Yang NN, Duan D. Questions answered and unanswered by the first CRISPR editing study in a canine model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Hum Gene Ther*, 2019.[Epub ahead of print]

(收稿日期:2019-05-10)