

Duchenne 型肌营养不良基因治疗研究进展

董奇超 陈慧敏 综述 金欣 审校

(绍兴文理学院医学院, 浙江 绍兴 312000)

[摘要] Duchenne 型肌营养不良 (DMD) 是由编码抗肌萎缩蛋白的 DMD 基因突变导致的 X 连锁隐性遗传病。它的特点是进行性肌无力和因缺乏抗肌萎缩蛋白而导致的骨骼肌和心肌退化。患儿多于 2~5 岁起病, 常在 20 岁左右死于心力衰竭或呼吸功能不全。目前, 临床上多采用支持疗法改善疾病症状, 但并不能改变疾病的最终结局。基因治疗的兴起为该病的治愈提供了希望。本文总结了 DMD 的基因替代疗法, 包括腺相关病毒介导的 DMD 基因转导技术、肌营养不良蛋白相关蛋白 (utrophin) 上调技术和成簇规律间隔的短回文重复序列基因编辑技术的研究进展, 并为解决腺相关病毒载量、转基因产物的长期有效表达、utrophin 蛋白表达量问题提出的建议进行综述, 为研究者们进一步研究提供参考。[中国当代儿科杂志, 2018, 20(8): 691-696]

[关键词] Duchenne 型肌营养不良; 腺相关病毒; 肌营养不良蛋白相关蛋白; 成簇规律间隔的短回文重复序列技术; 儿童

A review of gene therapy for Duchenne muscular dystrophy

DONG Qi-Chao, CHEN Hui-Min, JIN Xin. Medical School of Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China (Jin X, Email: zjujx@qq.com)

Abstract: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked recessive hereditary disease caused by mutations in the DMD gene that encodes dystrophin. It is characterized by progressive muscle weakness and degeneration of skeletal muscle and myocardium due to the absence of dystrophin. The disease often occurs at the age of 2-5 years, and most children may die of heart failure or respiratory insufficiency at the age of around 20 years. At present, supportive therapy is often used in clinical practice to improve symptoms, but this cannot improve the outcome of this disease. The development of gene therapy brings new hope to the cure of this disease. This article summarizes gene replacement therapy for DMD, including the research advances in DMD gene transduction technology mediated by adeno-associated virus, utrophin protein upregulation technology, and clustered regularly interspaced short palindromic repeat gene editing technology, and reviews the recommendations to solve the issues of adeno-associated viral load, long-term effective expression of transgenic products, and utrophin protein expression, in order to provide a reference for further research.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(8): 691-696]

Key words: Duchenne muscular dystrophy; Adeno-associated virus; Utrophin; Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; Child

Duchenne 型肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是进行性肌营养不良中最常见的类型, 以进行性、致死性为主要特点。世界上每 3500~6000 个新生男婴中就有一名 DMD 患儿^[1], 患儿通常于 2~5 岁时开始出现临床症状, 主要表

现为四肢近端开始的两侧对称进行性肌无力, 同时累及心肌和呼吸肌, 12 岁左右丧失行走能力, 多于 20 岁死于心力衰竭或呼吸功能不全^[2], 给患者个人、家庭和社会造成沉重心理和经济负担。

DMD 是由 DMD 基因突变导致其编码的抗肌

[收稿日期] 2018-04-09; [接受日期] 2018-07-04

[基金项目] 浙江省自然科学基金公益性技术应用研究计划 (LGF18H160014); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划 (2016R428030)。

[作者简介] 董奇超, 男, 本科生。

[通信作者] 金欣, 女, 讲师。

萎缩蛋白 (dystrophin) 缺失或功能丧失引起的。Dystrophin 蛋白位于肌细胞膜下的胞质内, 其通过连接肌动蛋白和 dystrophin 相关跨膜糖蛋白复合物, 从而连接细胞内骨架和细胞外基质, 保证肌细胞收缩时肌膜的完整性。当 dystrophin 蛋白缺失时, 肌膜因结构稳定性下降而断裂, 细胞外液及钙离子流入细胞内, 激活蛋白酶途径, 增加蛋白降解, 引起肌细胞坏死。DMD 编码基因位于 Xp21.1, 其 cDNA 长 14 kb, 是人类最大的编码基因。该基因突变率高, 以外显子缺失最为常见, 占 55%~65%; 点突变占 25% 左右; 重复突变约占 8%^[3]。此外, 约有 1/3 系新发突变^[4]。目前, 临床上多采用糖皮质激素类药物和支持疗法改善疾病症状, 但并不能改变疾病的最终结局; 成肌细胞移植治疗 DMD 的研究因成肌细胞迁移能力差、存活率低和免疫排斥反应过强停滞不前; 肌源性干细胞治疗 DMD 的研究也存在分化调控机制不清等问题^[5]。鉴于 DMD 发病直接源于 DMD 基因的缺陷, 基础研究者们拟从基因水平纠正这一缺陷, 从而达到根治目的。本文将就基因替代疗法: 包括腺相关病毒介导的 DMD 基因转导、肌营养不良蛋白相关蛋白 (utrophin) 的上调策略和成簇规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 基因编辑治疗为主题做一综述, 并为解决腺相关病毒载量、转基因产物的长期有效表达、utrophin 蛋白表达量的问题提出了相应的研究建议, 为研究者们提供相应研究方向的参考。

1 腺相关病毒介导的 DMD 基因转导

腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 外包二十面体衣壳蛋白, 为无包膜单链线状 DNA 缺陷型病毒。目前已发现 AAV 的 12 种血清型和 130 多种突变型^[6], 各型的转染率和组织特异性有所不同。其中, 对骨骼肌的组织特异性以 AAV1、6、8 较高, 心肌则以 AAV9 最高^[7]。基因转导中有许多载体可供选择, 因 AAV 具有宿主范围广、安全性高、

转染率高等特点, 被公认为是治疗 DMD 的最佳基因载体。

AAV 广泛的宿主范围可同时针对 DMD 所需的治疗靶点: 心肌和骨骼肌, 但这也是治疗 DMD 的缺点之一: 导入的 AAV 可能作用于身体正常组织而引起副作用。为此, 研究者们通过开发针对心肌和骨骼肌组织特异性的新型 AAV, 优化 AAV 的感染靶向性和转录靶向性等策略相结合来解决该问题。在安全性方面, 迄今尚未发现野生型 AAV 对人体致病。而重组腺相关病毒 (rAAV) 基因组序列不再有 Rep 基因, 因而不能表达具有杀细胞毒性及细胞生长抑制的 Rep 蛋白, 进一步保证了安全性。此外, AAV 载体通常作为附加体持续存在于胞质中, 限制了插入诱变或致癌基因的活化风险。转染率方面, 研究者们通过开发混合衣壳载体、自身互补型 AAV (scAAV) 而提高转染率。然而 scAAV 包装容量通常不能超过 2.1 kb^[8], 对承载 DMD 基因有一定的局限性。

在 AAV 介导的基因治疗中有两个技术难点需要突破。其一是载量问题, 承载能力约为 4.7 kb 的 AAV 载体无法承载全长为 11.1 kb 的 dystrophin 编码序列^[9]。其二是目前主要的技术难点: 转基因产物的长期有效表达问题。其中, 宿主对 AAV 衣壳和转基因产物的免疫应答是阻碍转基因产物长期有效表达的首要原因。目前, 研究者们针对 AAV 载量和免疫应答问题提出了许多解决方案 (表 1)。但也有研究者认为宿主免疫应答不会阻碍转基因产物长期有效表达, 因为在 AAV 转导 LPL 基因治疗的研究中, 机体对 AAV 衣壳的抗体反应和 T 细胞免疫反应并没有阻止 LPL 的持续表达, 也未损害 LPL 的生物学效应^[10]。另外, Mueller 等^[11]进行的 AAV1 介导的 AAT 肌肉注射转导研究表明, 机体存在的 AAT 特异性 T 细胞仍允许转基因产物长期表达, 且表达量未见明显改变。然而与 dystrophin 蛋白不同的是, AAT 和 LPL 均存在于正常人血液循环之中, 这个不同点使机体对转基因产物的免疫应答是否造成区别有待探究。

表1 AAV介导的DMD基因转导技术难题研究进展

技术难点	解决方案	实验进展	对研究者的建议
AAV 承载能力	(1) 导入截短 mini-dystrophin 基因	mdx 鼠和 DMD 犬等 30 多项动物实验证实有效 ^[12] , 但截短后的 dystrophin 缺少 nNOS 等部位而不能完全治愈 DMD 患者	可将 AAV 衣壳修饰和双载体技术相结合, 或许能在兼顾转导效能情况下解决载量问题。
	(2) 运用双载体承载更完整基因	DMD 犬中获得成功 ^[13] , 但仍不能导入全长 dystrophin cDNA	
	(3) 运用三载体承载全长基因	mdx 鼠肌肉中表达全长 dystrophin 蛋白, 但转导效能极低 ^[8]	
	(4) 经 AAV 衣壳修饰增加载量	rAAV2/HBoV1 嵌合载体承载能力增大 ^[14]	
免疫应答	(1) 使用免疫抑制剂	mdx 鼠和犬模型中基因表达的持续时间更长 ^[15]	应完善 DMD 早期产前筛查和诊断体系
	(2) 诱导口服免疫耐受	在胎儿期犬的羊水内注入载有 micro-dystrophin 的 rAAV 成功诱导口服免疫耐受, 但由于 DMD 早期产前筛查和诊断体系尚不完善, 该法运用于人体仍存局限性 ^[16]	
	(3) 衣壳修饰技术	AAV 衣壳表面用苯丙氨酸 (F) 残基替换暴露的酪氨酸 (Y) 残基, 在 mdx 鼠和犬模型中减轻免疫反应 ^[14]	
	(4) 通过提升目的基因表达效能而减少递送所需载体量而减轻免疫应答	运用 AAV 承载表达效能增至原先 8~12 倍的突变 IX-R338L 基因治疗血友病 B, 临床试验患者出血发生率降低了 96%, 凝血因子输注量减少了 99% ^[17]	

注: * 示人类所有细胞中均存在的表面标记 CD47, 可与巨噬细胞上的信号调节蛋白 α 相互作用, 阻止它摄取自身细胞, 若将 CD47 插入到 AAV 衣壳中, 则有望减少巨噬细胞摄取而降低免疫应答。

另外, Dupont 等^[19]在经 AAV 介导的 DMD 基因治疗的 mdx 鼠和 DMD 犬中发现, AAV 介导的基因转录的 mRNA 氧化增加, 推测 AAV 介导基因转录的 mRNA 的氧化应激也影响了其长期有效表达, 而当转入的治疗性基因达到高表达水平时, mRNA 的氧化却不明显。借鉴 George 等^[17]用 AAV 承载表达效能增至原先 8~12 倍的突变 IX-R338L 基因, 成功治疗血友病患者的研究。建议研究者将研究方向定位于提升导入 DMD 基因的表达效能, 从而在降低转录后 mRNA 氧化的同时减少递送所需载体量而降低免疫应答, 经此或能取得该疗法的成功^[19]。

2 Utrophin 蛋白的上调策略

Utrophin 与 dystrophin 蛋白具有 80% 的同源性, 结构相近, 功能相似。Utrophin 在胎儿时表达于肌膜, 随着妊娠结束, 肌肉成熟, utrophin 逐渐被 dystrophin 所取代^[20]。在成人中, utrophin-A 主要表达于神经肌肉接头和肌腱连接处; utrophin-B

主要表达于血管内皮细胞^[21]。在 DMD 患者和 mdx 鼠中, 肌纤维重塑时, utrophin-A 在肌膜处的表达被上调。因此, 可以通过上调 utrophin 代偿 dystrophin 来治疗 DMD。Dystrophin/utrophin 双基因敲除和 utrophin 转基因实验证实了这一治疗设想的可行性^[20,22]。

研究者们开发出多种上调 utrophin 的方案, 但大多仍处于临床前研究阶段 (表 2)。其中 SMT C1100 药物口服治疗方案已进入临床试验, 并获得了 FDA 快速通道审批资格。在 I 期临床试验中, 健康成人^[23]和患病儿童^[24]均表现出良好的安全性和耐受性, 但其血药浓度未达到理想水平。研究中发现高脂饮食者 SMT C110 的血药浓度较高, 进一步的临床试验正通过对患者的饮食控制评价该药物的有效性 (www.clinicaltrials.gov; NCT02383511)^[23-24]。目前已研发出该系列药物的第二代 (SMT022357), 能上调 mdx 鼠包括心肌等在内的广泛肌肉细胞中的 utrophin, 相对第一代, 其在体内代谢更加稳定, 并能上调更高的 utrophin 表达量^[25]。

表2 Utrophin 蛋白的上调方法

具体方法	研究阶段 / 选择模型	治疗结果	参考文献
SMT C1100	临床I期试验 / 健康成人、儿童 DMD 患者	健康成人和儿童患者未对 SMT C1100 产生严重不良反应，安全，可耐受。	[23-24]
SMT022357	临床前研究 / mdx 鼠	Mdx 鼠的心肌、呼吸肌、骨骼肌的 utrophin-A 蛋白均被上调；10 μmol/L 的 SMT022357 治疗后 mdx 鼠细胞的 utrophin 蛋白上调约 2.5 倍。抑制了 mdx 鼠肌纤维的坏死和纤维化，提升了肌膜的稳定性。	[25]
人工锌指转录因子“Jazz”上调 utrophin-A 启动子	临床前研究 / mdx 鼠	Mdx 鼠中心肌和骨骼肌的 utrophin-A mRNA 上调约两倍，减轻了肌纤维的坏死和炎性浸润，增加了肌肉的收缩力。	[26]
重组 TAT-μUtr 和 TAT-Utr 的蛋白替代疗法	临床前研究 / mdx 鼠	Mdx 鼠的血清肌酸磷酸激酶 (CK) 降低，减轻了肌肉的凋亡和重塑，以及肌肉收缩所致肌力下降的敏感性。	[27-28]
肝素和 AICAR 的联合治疗	临床前研究 / mdx 鼠	肝素使 mdx 鼠的膈肌、胫骨前肌等处上调 utrophin-A 蛋白约 2 倍；Mdx 鼠肌膜完整性得到提升，慢肌纤维表达增加。肝素和 AICAR 的联合治疗对上调 utrophin-A 产生叠加效应。	[29]
二甲双胍	临床前研究 / C2C12 细胞、mdx 鼠	增加了 C2C12 细胞和 mdx 鼠骨骼肌的 utrophin A (上调约 50%) 含量。	[30]
CRISPR/Cas9 介导的 utrophin 上调	临床前研究 / 来自 DMD 患者的肌细胞	上调了 DMD 患者细胞中 utrophin-A 1.7~2.7 倍。	[31]

注：Utrophin 在 mdx 鼠组织表达量为野生型的 2 倍时即可极大改善其症状。

基础研究方面已深入到信号通路。IL-6^[30,32]、二甲双胍 (MET) 和 AICAR、肝素可分别通过激活 NRG-1/ErbB、骨骼肌腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、p38 而上调 utrophin-A。Ljubacic 等^[30]研究发现，AICAR 通过激活 AMPK/PGC1-α 信号通路提高 utrophin 转录水平。而肝素通过激活 p38，使 KSPR 磷酸化而抑制 KSPR 的功能，进而使 KSPR 与 AREs 解离，可提高 utrophin-A mRNA 的稳定性。两者的联合使用对上调 utrophin 蛋白产生了叠加效应，建议研究者进行动物实验以寻找在安全范围内两药能上调 utrophin 最大量的最佳比例。

与其他基因治疗方法比较，这一治疗策略的优势在于：(1) 利用自身上调的蛋白，不会引起免疫应答；(2) 适用于任何突变类型的 DMD 患者；(3) 通过不同的方案联合也许可以产生叠加效应而提升治疗的有效性并规避不良反应。不足之处：(1) 结构上的差异性导致 utrophin 不能完全取代 dystrophin；(2) 过度上调 utrophin 是否会对患者带来不良影响仍未可知。

3 CRISPR 基因编辑

近几年来基因编辑技术发展迅速，相继出现锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应因子核酸酶 (transcription activator-like

effector nuclease, TALEN) 和 CRISPR 等技术。与前两者相较，CRISPR 更为经济高效，是目前基因编辑技术的研究热点。用 CRISPR 进行基因编辑时常由引导 RNA (guide RNA, gRNA) 将核酸内切酶 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 引导至靶 DNA 的原型间隔序列毗邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 附近的目标序列使 DNA 链断裂，后通过机体内非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组修复 (homology directed repair, HDR) 机制完成基因编辑^[33-34]。NHEJ 使断裂的 DNA 两端直接相连或随机引入一段序列。HDR 则以同源序列为模板，在断裂的 DNA 之间精确引入、替换、敲除序列。来自于不同细菌的 Cas 蛋白可分为 2 类 5 型^[33]，其中对 Cas9 的研究较为深入。CRISPR 作用十分强大，可通过外显子的跳读、引入和删除以及移码突变等方式进行基因编辑^[35]。

针对 DMD 基因 45~55 号外显子突变热点，Ousterout 等^[36]运用 CRISPR/Cas9 对 DMD 患者来源的成肌细胞进行基因编辑，通过外显子删除和框架移码阅读等多种方式，成功修复了 dystrophin 蛋白的表达。Young 等^[37]则用其直接删除 DMD 基因中长达 725 kb 的 45~55 号外显子，使人诱导多能干细胞来源的肌细胞中表达 dystrophin，并提升了肌膜的完整性。随后，他们在 hDMD/mdx

鼠中进一步证实了该法的有效性,这便意味着约60%的DMD患者可通过该法治疗^[38]。对于重复突变,Lattanzi等^[39]和Wojtal等^[31]所带领的团队用CRISPR/Cas9分别删除了2号外显子和18~30号外显子的重复,使细胞表达出全长的dystrophin蛋白。综合此类实验成果,理论上用CRISPR/Cas9删除外显子的方式可治疗80%左右的DMD患者^[40]。然而若对每位患者都进行不同基因的特定编辑,工作量较大,建议研究者对不同突变类型的患者进行分组,在各组中寻求统一的疗法。

2015年,Zetsche等^[41]在氨基酸球菌属和毛螺菌科中发现了Cpf1(Cas12a);与Cas9相比,其优点在于^[42]:Cas9切割DNA形成一个平末端,而Cpf1切割DNA形成一个有5个核苷酸突出的黏性末端,使后者在断端进行基因插入时,可以使插入基因通过NHEJ修复以可控的方向插入靶位点,而不必依赖于HDR,故其修复效能得到提升;与目前广泛使用的来源于酿脓链球菌的Cas9相较,Cpf1及其gRNA更小,在转导到组织细胞时其对载体容量要求更低;其产生的脱靶效应概率更低。目前已有研究者用CRISPR-Cpf1成功修复了来源于患者的诱导性多能干细胞的突变,使其分化成的心肌细胞收缩力增强;也成功纠正了mdx鼠的突变基因,使mdx鼠的病理状态得到改善^[43]。另外,Cas9识别位于靶序列的3'端的富含胞嘧啶(C)的PAM序列(5'-NGG-3'),而Cpf1识别位于靶序列5'端富含胸腺嘧啶(T)的PAM序列。若将两者结合,则在靶序列的识别上可以形成的互补作用,将使更多突变类型的DMD患者受益。随着研究的深入,新发现的Cas酶亦逐渐增多^[35]:如CasX和CasY,其比Cas9小且具有特殊的识别位点。随着新型酶的发现,CRISPR基因编辑工具将变得更加强大。

CRISPR/Cas9亦可调节基因表达:将失去催化活性的Cas9(dCas9)导入至细胞中,使其与特定结构域结合;或将dCas9与一转录激活因子融合导入来调控基因表达。运用该法,Wojtal等^[31]在肌细胞中将utrophin-A蛋白上调了1.7~2.7倍。Perrin等^[44]上调了mdx鼠和C2C12细胞中连接细胞外基质和肌膜上整合素 $\alpha 7\beta 1$ 的层粘连蛋白亚基 $\alpha 1$,替代了dystrophin蛋白的功能。另外,Komor等^[45]运

用dCas9与胞苷脱氨酶偶联,在不切割DNA的前提下,成功催化靶DNA链上的胞嘧啶转化为尿嘧啶,这一研究成果使CRISPR系统能更为高效地校正点突变,理论上可治疗约25%的DMD人群。综上,若研究者们将CRISPR的基因编辑和基因调节相结合,则会对DMD产生更为广泛的治疗效应。

目前CRISPR仍处于实验室研究阶段,在进行临床试验之前仍需解决一些问题。其中首要的便是基因编辑工具中普遍存在的脱靶效应。学者们现已提出一些解决方案:例如,适当缩短gRNA^[46]、Cas9的定点突变^[47],运用抗CRISPR蛋白“AcrIIA4”等。其次,机体对CRISPR的免疫应答仍需进一步探究,近期Kim等^[48]研究指出,体外转录gRNAs中的5'-三磷酸(5'ppp)部分,会激活人类细胞中的免疫应答,导致细胞死亡,这将使治疗无效。

4 展望

DMD的发病机制已研究明确,针对该疾病本质的治疗——基因疗法也取得了很大的进步。其中针对DMD无义突变的终止密码子跨越治疗药物已在德国上市,外显子跳跃治疗的反义寡核苷酸药物Eteplirsen在II期临床试验中效果明显,并已通过FDA审批。然而上述药物的缺陷在于只能治疗特定DMD基因突变类型的患者。随着对基因治疗研究的深入,研究者们已开发出可治疗所有DMD患者的基因替代疗法:AAV介导的DMD基因转导和Utrophin蛋白的上调策略。其中,AAV介导的DMD基因转导在I期临床试验中安全性良好,AAV载量问题也已初步得到解决,研究者们正在解决dystrophin长期有效表达的难题。目前AAV介导的基因疗法在遗传性黑蒙症、血友病等疾病已取得成功,相信不久之后也将攻克DMD。而在Utrophin蛋白的上调策略中,药物SMT C1100口服治疗方案已进入临床试验,并获得了FDA快速通道审批资格,目前也已开发出更为有效的二代药物。另外,最近几年CRISPR基因编辑技术在用于DMD的治疗上更是研究热点,并已在mdx鼠实验中取得疗效,有望成为治疗DMD的最佳手段之一。

[参考文献]

- [1] 戴毅, 崔丽英. Duchenne 型肌营养不良分子发病机制及基因治疗新进展[J]. 中华神经科杂志, 2011, 44(5): 350-353.
- [2] 何若洁, 张成. Duchenne 型肌营养不良症骨骼肌损害的免疫机制及其治疗研究[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(7): 574-578.
- [3] 刘延波, 徐乃军, 贾飞勇. Duchenne 肌营养不良 (DMD) 发病机制及治疗研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(4): 354-361.
- [4] 吴志英, 陈雪娇. 肌营养不良分子遗传学研究现状和对策[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(5): 313-316.
- [5] 崔思颖, 蔡奥捷, 孔祥东. 杜氏肌营养不良基因治疗研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2017, 55(9): 717-719.
- [6] 黄灿, 陈珍. 腺相关病毒的研究进展与展望[J]. 生物灾害科学, 2014, 37(4): 333-336.
- [7] Boutin S, Monteilhet V, Veron P, et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(6): 704-712.
- [8] Wu Z, Sun J, Zhang T, et al. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose[J]. Mol Ther, 2008, 16(2): 280-289.
- [9] Koo T, Popplewell L, Athanasopoulos T, et al. Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice[J]. Hum Gene Ther, 2014, 25(2): 98-108.
- [10] Ferreira V, Petry H, Salmon F. Immune responses to AAV-vectors, the glybera example from bench to bedside[J]. Front Immunol, 2014, 5: 82.
- [11] Mueller C, Chulay JD, Trapnell BC, et al. Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression[J]. J Clin Invest, 2013, 123(12): 5310-5318.
- [12] Dupont JB. Restriction factors against recombinant adeno-associated virus vectormediated gene transfer in dystrophin-deficient muscles[J]. Curr Gene Ther, 2016, 16(3): 168-183.
- [13] Kodippili K, Hakim CH, Pan X, et al. Dual AAV gene therapy for duchenne muscular dystrophy with a 7-kb mini-dystrophin gene in the canine model[J]. Hum Gene Ther, 2018, 29(3): 299-311.
- [14] Nance ME, Duan D. Perspective on adeno-associated virus capsid modification for duchenne muscular dystrophy gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2015, 26(12): 786-800.
- [15] Wang Z, Tapscott SJ, Chamberlain JS, et al. Immunity and AAV-mediated gene therapy for muscular dystrophies in large animal models and human trials[J]. Front Microbiol, 2011, 2: 201.
- [16] Hayashita-Kinoh H, Yugeta N, Okada H, et al. Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance[J]. Mol Ther, 2015, 23(4): 627-637.
- [17] George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant[J]. N Engl J Med, 2017, 377(23): 2215-2227.
- [18] Le Guiner C, Servais L, Montus M, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy[J]. Nat Commun, 2017, 8: 16105.
- [19] Dupont JB, Tournaire B, Georger C, et al. Short-lived recombinant adeno-associated virus transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2015, 2: 15010.
- [20] Guiraud S, Chen H, Burns DT, et al. Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy[J]. Exp Physiol, 2015, 100(12): 1458-1467.
- [21] Weir AP, Burton EA, Harrod G, et al. A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle[J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45285-45290.
- [22] van Westering TL, Betts CA, Wood MJ. Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy[J]. Molecules, 2015, 20(5): 8823-8855.
- [23] Tinsley J, Robinson N, Davies KE. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to healthy male adult volunteers[J]. J Clin Pharmacol, 2015, 55(6): 698-707.
- [24] Ricotti V, Spinty S, Roper H, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to pediatric patients with duchenne muscular dystrophy[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152840.
- [25] Guiraud S, Squire SE, Edwards B, et al. Second-generation compound for the modulation of utrophin in the therapy of DMD[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(15): 4212-4224.
- [26] Strimpakos G, Corbi N, Pisani C, et al. Novel adeno-associated viral vector delivering the utrophin gene regulator jazz counteracts dystrophic pathology in mdx mice[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(9): 1283-1291.
- [27] Sonnemann KJ, Heun-Johnson H, Turner AJ, et al. Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice[J]. PLoS Med, 2009, 6(5): e1000083.
- [28] Call JA, Ervasti JM, Lowe DA. TAT-μUtrophin mitigates the pathophysiology of dystrophin and utrophin double-knockout mice[J]. J Appl Physiol (1985), 2011, 111(1): 200-205.
- [29] Peladeau C, Ahmed A, Amirouche A, et al. Combinatorial therapeutic activation with heparin and AICAR stimulates additive effects on utrophin A expression in dystrophic muscles[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(1): 24-43.
- [30] Ljubicic V, Jasmin BJ. Metformin increases peroxisome proliferator-activated receptor γ Co-activator-1 α and utrophin a expression in dystrophic skeletal muscle[J]. Muscle Nerve, 2015, 52(1): 139-142.
- [31] Wojtal D, Kemaladewi DU, Malam Z, et al. Spell checking nature: versatility of CRISPR/Cas9 for developing treatments for inherited disorders[J]. Am J Hum Genet, 2016, 98(1): 90-101.
- [32] Juretić N, Diaz J, Romero F, et al. Interleukin-6 and neuregulin-1 as regulators of utrophin expression via the activation of NRG-1/ErbB signaling pathway in mdx cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1863(3): 770-780.

- [33] Duan D. A new kid on the playground of CRISPR DMD therapy[J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2017, 28(2): 62-64.
- [34] Iyombe-Engembe JP, Ouellet DL, Barbeau X, et al. Efficient restoration of the dystrophin gene reading frame and protein structure in DMD myoblasts using the CinDel method[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5: e283.
- [35] Gee P, Xu H, Hotta A. Cellular reprogramming, genome editing, and alternative CRISPR Cas9 technologies for precise gene therapy of duchenne muscular dystrophy[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 8765154.
- [36] Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6244.
- [37] Young CS, Hicks MR, Ermolova NV, et al. A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(4): 533-540.
- [38] Young CS, Mokhonova E, Quinonez M, et al. Creation of a novel humanized dystrophic mouse model of duchenne muscular dystrophy and application of a CRISPR/Cas9 gene editing therapy[J]. *J Neuromuscul Dis*, 2017, 4(2): 139-145.
- [39] Lattanzi A, Duguez S, Moiani A, et al. Correction of the Exon 2 duplication in DMD myoblasts by a single CRISPR/Cas9 system[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 11-19.
- [40] Mendell JR, Rodino-Klapac LR. Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment[J]. *Cell Res*, 2016, 26(5): 513-514.
- [41] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [42] Zaidi SS, Mahfouz MM, Mansoor S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing[J]. *Trends Plant Sci*, 2017, 22(7): 550-553.
- [43] Zhang Y, Long C, Li H, et al. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice[J]. *Sci Adv*, 2017, 3(4): e1602814.
- [44] Perrin A, Rousseau J, Tremblay JP. Increased expression of laminin subunit alpha 1 chain by dCas9-VP160[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 6: 68-79.
- [45] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [46] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 279-284.
- [47] Wang JZ, Wu P, Shi ZM, et al. The AAV-mediated and RNA-guided CRISPR/Cas9 system for gene therapy of DMD and BMD[J]. *Brain Dev*, 2017, 39(7): 547-556.
- [48] Kim S, Koo T, Jee HG, et al. CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells[J]. *Genome Res*, 2018. [Epub ahead of print].

(本文编辑: 万静)