

文章编号 1006-8147(2019)03-0215-05

论 著

己糖对杜兴肌肉萎缩症核酸药物 Pip5e-PMO 跳读活性研究

宁含含¹, 顾 犇¹, 韩 刚², 林曹瑞¹, 尹海芳¹

(1.天津医科大学基础医学院细胞生物学系,天津 300070;2.天津医科大学医学检验学院,天津 300203)

摘要 目的:在杜兴肌肉萎缩症模型上探究己糖混合物对核酸药物 Pip5e-PMO 介导的外显子跳读活性的促进作用。方法:选择成年 *mdx* 小鼠为测试动物模型,通过局部肌肉和系统尾静脉注射,比较 Pip5e-PMO 与己糖和生理盐水联用的作用效果,利用免疫荧光(IHC)和蛋白印迹法(Western blot)检测 dystrophin 阳性肌纤维的数量和分布及 dystrophin 蛋白的表达水平;利用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测外显子跳读。结果:在局部肌肉给药试验中,己糖能够促进 Pip5e-PMO 诱导 dystrophin 蛋白表达水平($P<0.05$)。在系统试验中,对己糖和生理盐水组比较发现:按 15 mg/kg 的剂量单次系统尾静脉注射 Pip5e-PMO,骨骼肌中 dystrophin 蛋白表达恢复至正常水平的 50%;在心脏中,也检测到明显的 dystrophin 恢复表达和外显子跳读。但两组无显著性差别($P>0.05$)。结论: Pip5e-PMO 可诱导有效的外显子跳读和 dystrophin 蛋白表达,但己糖对其促进效果有限。

关键词 杜兴肌肉萎缩症;外显子跳读;己糖;肽修饰 PMO;抗肌萎缩蛋白

中图分类号 Q291

文献标志码 A

Effect of hexoses on Pip5e-PMO mediated exon-skipping in the Duchenne muscular dystrophy mouse model

NING Han-han¹, GU Ben¹, HAN Gang², LIN Cao-rui¹, YIN Hai-fang¹

(1. Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract Objective: To explore the potential of hexose (the mixture of glucose and fructose -GF) in enhancing the delivery of peptide-modified PMO (Pip5e-PMO) in the Duchenne Muscular Dystrophy(DMD) mouse model (*mdx* mouse). **Methods:** Pip5e-PMO in GF or saline was intramuscularly or intravenously administered into adult *mdx* mice. Immunohistochemistry(IHC) and Western blot were used to measure the distribution and expression of dystrophin. Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) was utilized to examine the level of exon skipping. **Results:** Local intramuscular results showed that GF enhanced the activities of Pip5e-PMO demonstrated by the increased number of dystrophin-positive fibers and level of dystrophin expression($P<0.05$). Although single intravenous injection of 15mg/kg Pip5e-PMO induced substantial number of dystrophin-positive fibers and therapeutic levels of dystrophin restoration in peripheral muscles and heart of *mdx* mice treated with either GF or saline, the difference between GF and saline groups was not significant($P>0.05$). **Conclusion:** GF could enhance the activities of Pip5e-PMO intramuscularly but may fail to have any impact on dystrophin-deficient *mdx* mice.

Key words DMD; exon skipping; hexose; Pip5e-PMO; dystrophin

杜兴肌肉萎缩症(Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)是一种伴X染色体隐性遗传的神经肌肉失调症,在新生男孩中的发病率约为1:3 500^[1]。DMD发病主要是由于抗肌营养萎缩蛋白—dystrophin缺失,导致肌肉细胞膜不稳定,大量钙离子内流,细胞结构破坏,从而导致肌肉退化和功能丧失,患者随着年龄增长会出现退行性的肌肉萎缩,平均寿命只有20岁左右^[2]。Dystrophin基因长2.4Mb,是人类已知的最大的基因之一^[3]。Dystrophin是抗肌肉萎缩蛋白相关复合物(dystrophy associated protein complex,

DAPC)的一个组成部分,它将DAPC与胞内肌动蛋白丝连接起来,对于维持肌肉细胞膜的完整性至关重要^[4]。目前关于治疗DMD的研究主要分为以下4类:细胞治疗^[5]、基因替代疗法^[6-7]、上调肌营养相关蛋白^[8-9]和特异性基因突变(包括外显子跳读^[10]和抑制过早终止密码子^[11])。其中外显子跳读被认为是目前最有潜力的治疗方式之一^[12]。外显子跳读能够恢复基因开放阅读框,从而产生结构部分缺失但仍具有生物学功能的dystrophin蛋白^[13]。如今临床上唯一批准可以用于治疗DMD的反义寡核苷酸药物是二酰胺吗啉代寡核苷酸(PMO),但是PMO介导dystrophin蛋白恢复水平较低,用药量大,价格昂贵^[14]。因此通过不同的方法增强PMO系统作用效果,如

基金项目 天津市教委科研计划项目基础理论研究项目(2016YD10)

作者简介 宁含含(1993-),女,硕士在读,研究方向:医学细胞生物学;

通信作者:尹海芳, E-mail:haifangyin@tmu.edu.cn。

将 PMO 与功能肽进行偶联或者利用辅助剂提高其作用效果是目前研究外显子跳读的主要方向^[15]。已有文献报道,利用细胞穿梭肽(Cell-penetrating peptide-Pip5e)共价修饰 PMO,可以提高 PMO 的运输效率,相比其他系列的功能肽在降低 PMO 的用量上具有极大的优势,并且以 25 mg/kg 的剂量在 *mdx* 小鼠上系统测试发现小鼠全身骨骼肌以及心肌的 dystrophin 蛋白能够恢复到野生型小鼠骨骼肌和心肌中水平,血清激酶水平显著下降^[16]。本课题组前期研究发现,己糖特别是葡萄糖和果糖的混合物(1:1),能够显著促进 PMO 的系统活性和运输效率^[17],但己糖对肽修饰的 PMO 的作用效果有待研究。因此,在本研究中,拟在 *mdx* 小鼠模型上,系统探究己糖对前期研发的细胞穿梭肽修饰的 PMO (Pip5e-PMO)的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 O.C.T 包埋剂购自美国 Sakura 公司, dystrophin 抗体购自 Abcam 公司, GeneRuler 100bp DNA ladder 购自美国赛默飞公司, RT-PCR OneStep kit 购自德国 QIAGEN 公司,山羊血清和胎牛血清购买于 Fermentas 公司, Bradford 试剂购自 Sango biotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 *mdx* 小鼠的饲养和给药处理 购买小鼠置于天津医科大学动物饲养中心,进行 SPF 级常规饲养。将 2 μ g Pip5e-PMO,与生理盐水(saline)及己糖混合物 GF(5%葡萄糖和 5%果糖等比混合)分别配制成 40 μ L 的药物注射液,注射到实验小鼠的胫前肌,每种处理保证 3 个重复。系统评估的注射方式为将 Pip5e-PMO 按 15 mg/kg 配制成 120 μ L 药物注射液,并通过尾静脉注入成年 *mdx* 小鼠,注射 1 次,两周后收样。

1.2.2 组织 RNA 的提取及反转录与扩增 利用冷冻切片机切取 8 μ m 的组织,收集适量加入 250 μ L Trizol 进行裂解。每个样品按 1:5 的比例加入氯仿进行抽提,并用涡旋振荡器震荡 15 s,静置 5 min。4 $^{\circ}$ C 离心机,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,加入等体积异丙醇,轻轻上下颠倒后室温静置 20 min。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清后,加入 250 μ L 75%乙醇(DEPC 水配制)进行漂洗。4 $^{\circ}$ C, 7 600 r/min 离心 5 min,弃去液体,可见白色沉淀,开盖晾干至残余的乙醇完全挥发。每个样品加入 20 μ L DEPC 水进行回溶。测浓度后以 400 ng RNA 作为模板进行 RT-PCR,引物序列为:Exon20Fo:5'-CAGA-ATTCTGC-CAATTGCTGAG-3';Exon26Ro:5'-TTCTTCAGC TTG

TGTCATCC-3'。得 cDNA 后继续进行 PCR 扩增,PCR 引物序列为:Exon20F1: 5'-CCCAGTCTAC-CACCCTATCAGAGC-3';Exon24R1: 5'-CCTGC-CTTTAAGGCTTCCTT-3'。

1.2.3 组织免疫荧光染色-dystrophin 染色 利用冷冻切片机切取 8 μ m 厚的组织切片,固定于防脱落载玻片上。用油笔圈出切片区域,浸泡在 1 \times PBS 10 min。每张切片滴加 100 μ L 左右封闭液(20%羊血清、20%胎牛血清和 60%PBS 配制封闭液),室温封闭 1.5 h。然后孵育一抗(一抗按 1:200 溶于稀释液中),室温 1.5 h。弃去一抗,滴加 PBS 清洗 3 遍,孵育二抗(荧光二抗按 1:200 溶于 DPBS 中),滴加 60 μ L 左右于切片上,避光孵育 1 h 左右。倾去二抗,PBS 清洗 3 遍后,滴加提前加入 DAPI 的封片剂,盖上盖玻片,避光晾干后即可进行观察拍照。

1.2.4 蛋白的提取 使用冷冻切片机切取小鼠全身肌肉组织并收集于 1.5 mL Ep 管中。按照每管 100 μ L 蛋白裂解液(95%裂解液和 5% β -巯基乙醇)加入到离心管里,用移液枪捣匀,保证裂解充分。金属浴 100 $^{\circ}$ C,变性 5 min,离心后吸取上清于新的离心管里。

1.2.5 蛋白浓度测定 Bradford 法测定蛋白浓度,首先利用 PBS 将蛋白样品稀释 100 倍,然后利用提前配置好的 5 种浓度梯度蛋白标准品(0、0.125、0.25、0.5 和 1 μ g/ μ L)制作标准曲线,加蛋白稀释液和 250 μ L 的 Bradford 试剂。轻轻混匀后,用酶标仪读取 595 nm 处的吸光度值。根据蛋白标准品制出蛋白标准曲线,最后依据曲线公式计算出样品的蛋白浓度。

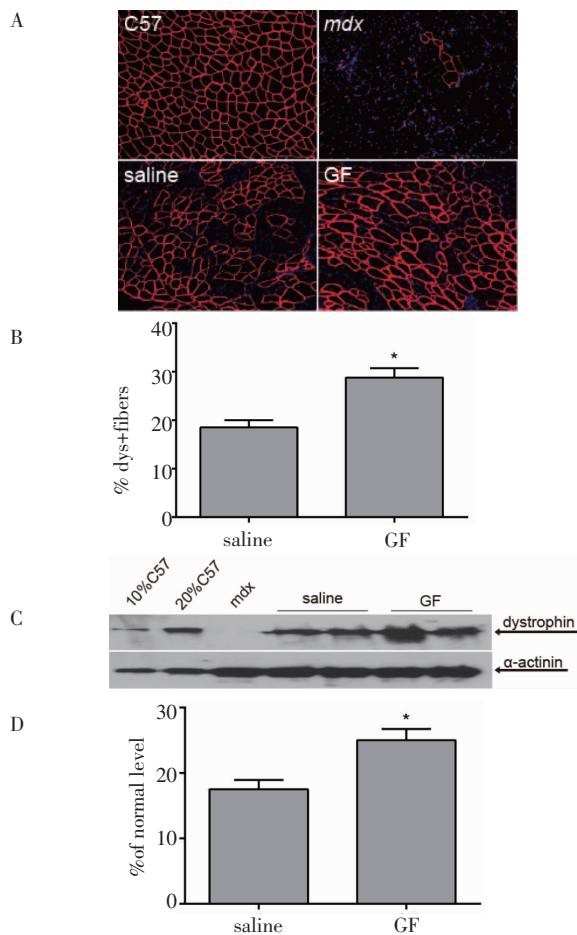
1.2.6 蛋白杂交检测 按 50 μ g 上样,使用 6%的聚丙烯酰胺凝胶,恒压电泳 3 h。然后转印至 PVDF 膜上,恒流 110 mA 转膜过夜,用 5%的脱脂牛奶封闭,按预染 marker 标记的分子量剪裁转印膜,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,使用 5%的脱脂牛奶清洗 PVDF 膜 3 遍,每遍 10 min。清洗完毕后,常温孵育二抗 2 h。使用 PBST 清洗二抗 3 遍,每遍 15 min。加入发光液后,压片曝光。

1.3 作图和统计学分析 使用 Photoshop、Adobe illustrator 软件作图,使用 Image J 软件进行数据分析,使用 SPSS22.0 进行统计分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义,所有数据至少进行 3 次独立实验验证。

2 结果

2.1 Pip5e-PMO 在 *mdx* 小鼠上的局部测试 前期研究发现:己糖对杜兴肌肉萎缩症反义寡核苷酸药

物(PMO)的药效有显著增强作用,且表现出一定的临床安全性,其中 GF 的作用效果尤为明显^[17]。同时,前期结果显示:在 *mdx* 小鼠上,Pip5e-PMO 能够介导高效的外显子跳读和 dystrophin 蛋白恢复表达^[18]。为测试 GF 对 Pip5e-PMO 活性的增强作用,将 2 μ g Pip5e-PMO 分别与 GF 和 saline 混合,对成年 *mdx* 小鼠的胫前肌进行局部注射。两周后取样,通过免疫荧光检测 dystrophin 阳性肌纤维数量和分布,结果显示:与 saline 组相比,Pip5e-PMO 与 GF 混合后,可有效地提高 dystrophin 阳性肌纤维数量(图 1A),dystrophin 阳性肌纤维数量相对于野生型从 19%提高到 29%($P=0.013\ 5, n=3$)(图 1B)。与免疫荧光结果相一致,利用 Western blot 对蛋白表达水平的检测结果显示:与 saline 组相比,蛋白表达水平由 17.5%提高到 25%($P=0.029\ 2, n=3$)(图 1C、D),说明 GF 能够促进 Pip5e-PMO 恢复 dystrophin 蛋白的表达,所以 GF 对 Pip5e-PMO 的活性有一定的促进作用。

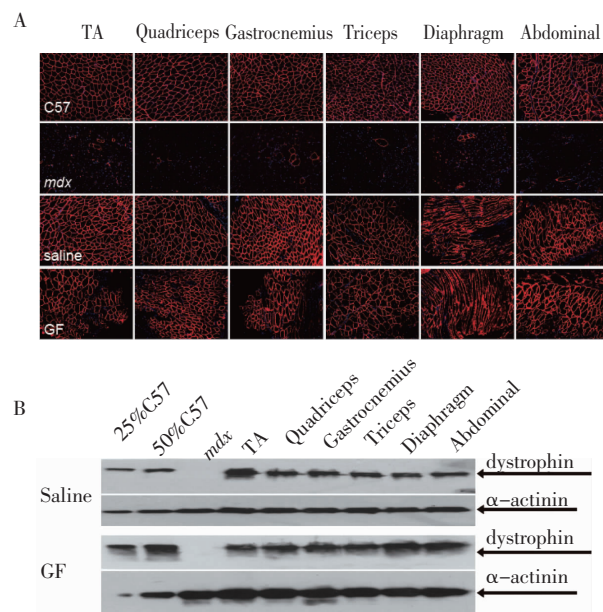


A.免疫荧光检测 dystrophin 的阳性率,其中红色区域为 dystrophin 阳性肌纤维,蓝色为细胞核染色(100 \times);B.免疫荧光结果定量分析比较,* $P<0.05$;C.Western blot 检测不同处理组中 dystrophin 蛋白的恢复情况, α -actinin 为内参蛋白;D.对 C 图 Western blot 结果进行定量分析,* $P<0.05$

图 1 局部肌肉注射 Pip5e-PMO 和生理盐水及 GF 混合后诱导 dystrophin 表达情况

Fig 1 Dystrophin expression in TA muscles of *mdx* mice treated with Pip5e-PMO in saline or GF intramuscularly

2.2 Pip5e-PMO 在 *mdx* 小鼠上的系统测试 为测试 GF 对系统注射的 Pip5e-PMO 活性影响,将 GF 与 15 mg/kg Pip5e-PMO 混合在 *mdx* 小鼠上进行系统尾静脉注射。免疫荧光结果显示,野生型小鼠具有均匀分布的 dystrophin 阳性肌纤维,而 *mdx* 小鼠基本无 dystrophin 阳性纤维(图 2A),相比于 *mdx* 组,saline 组和 GF 组在全身骨骼肌中有大量的 dystrophin 阳性肌纤维均匀分布(图 2A)。通过 Western blot 对 dystrophin 蛋白恢复水平进行定量验证,GF 组与 saline 组相比,在不同骨骼肌中 dystrophin 蛋白的恢复水平平均达到 50%左右,结果与免疫荧光显示具有一致性($P>0.05$)(图 2B),说明相对于不表达 dystrophin 蛋白的 *mdx* 小鼠,Pip5e-PMO 能介导 *mdx* 小鼠全身骨骼肌中 dystrophin 蛋白恢复,但 GF 对 Pip5e-PMO 的活性增强效果有限。



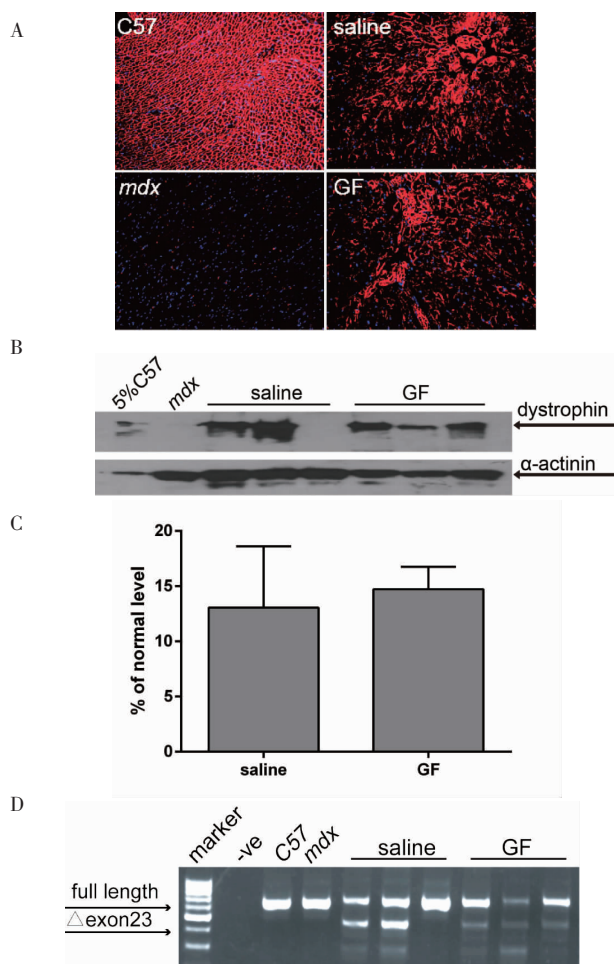
A.免疫荧光检测 dystrophin 的阳性率,其中红色区域为 dystrophin 阳性肌纤维,蓝色为细胞核染色(100 \times);B.Western blot 检测 15 mg/kg Pip5e-PMO 系统尾静脉给药处理后 dystrophin 蛋白的恢复情况, α -actinin 为内参蛋白

图 2 Pip5e-PMO 联合使用生理盐水和 GF 在不同骨骼肌中系统测试 dystrophin 表达情况

Fig 2 Dystrophin expressions in different muscles of *mdx* mice treated with 15 mg/kg Pip5e-PMO in saline and GF systemically

2.3 Pip5e-PMO 系统测试在 *mdx* 小鼠心肌中测试效果评估 为了探究 15 mg/kg Pip5e-PMO 在 *mdx* 小鼠心肌中的活性,对系统尾静脉给药处理的小鼠心肌组织进行 dystrophin 检测。免疫荧光结果显示,相比 *mdx* 阴性对照组,15 mg/kg 的 Pip5e-PMO 有助于心肌中 dystrophin 阳性纤维数目的提高(图 3A),但 GF 与 saline 组无明显差异($P>0.05, n=3$)。

Western blot 结果显示,相比于 C57 阳性对照,给药剂量为 15 mg/kg 的 Pip5e-PMO 对 *mdx* 小鼠心肌中 dystrophin 蛋白的恢复能达到 12.5%以上,但是 GF 组与 saline 无明显差异 ($P>0.05, n=3$)(图 3B、C)。RT-PCR 结果显示,相比于 saline 组,GF 处理组在 mRNA 水平上没有表现出差异 ($P>0.05, n=3$)(图 3D)。以上结果说明,15 mg/kg Pip5e-PMO 对成年 *mdx* 小鼠心肌中 dystrophin 蛋白的恢复能力至少能达到正常水平的 12.5%,而 GF 无进一步促进 Pip5e-PMO 的效果。



A.免疫荧光检测显示心肌中 dystrophin 的阳性纤维,其中着色区域为 dystrophin 阳性肌纤维,蓝色为细胞核染色(100×);B.Western blot 检测心肌中 dystrophin 蛋白的恢复情况,α-actinin 为内参蛋白;C.对 B 图中的 Western blot 结果进行定量分析, $P>0.05$;D.RT-PCR 显示不同处理组心肌细胞中外显子 23 跳读情况

图 3 不同处理组 *mdx* 小鼠心肌 dystrophin 蛋白表达以及外显子跳读情况

Fig 3 Dystrophin protein expressions and exon skipping products in different treated groups in *mdx* mice

3 讨论

杜兴肌肉萎缩症的发病群体主要为新生男孩,是一种伴 X 染色体的隐性遗传病,患病男孩的平均

寿命为 21 岁,根据最新文献报道,在过去的 20 到 30 年里,关于 DMD 的诊断和治疗都取得了可观的进步^[18]。本文利用了杜兴肌肉萎缩症模型 *mdx* 小鼠,其外显子 23 发生突变而不表达肌营养不良蛋白,典型特征是肌肉随着年龄增长会发生退化,出生 3 周后血清激酶水平明显上升^[19],8 周开始慢性损伤加剧,并持续一年,能够在一定程度上模拟 DMD 患者的病理状态^[20]。

反义寡核苷酸介导的外显子跳读对于 DMD 治疗具有巨大的潜力^[21]。早期研究表明 Pip5 系列多肽是改良的细胞穿梭肽,可偶联反义寡核苷酸药物,在介导的外显子跳读上活性高^[16]。本文利用前期报道的己糖混合物 GF 联合 Pip5e-PMO 来研究 Pip5e-PMO 恢复 dystrophin 蛋白的效果,通过局部肌肉注射初步比较 GF 与生理盐水对 Pip5e-PMO 的辅助作用效果,发现 GF 对 Pip5e-PMO 恢复 dystrophin 蛋白有一定的促进作用,为了继续探究 GF 对 Pip5e-PMO 的作用效果,通过将二者混合后系统给药以检测全身骨骼肌中 dystrophin 蛋白恢复水平。

根据前期实验研究,Pip5e-PMO 能够显著恢复 dystrophin 蛋白的水平^[9]。为了探究 Pip5e-PMO 对 *mdx* 小鼠全身肌肉的恢复情况,通过系统尾静脉注射 Pip5e-PMO,可以发现 15 mg/kg 剂量的 Pip5e-PMO 能够明显提高 *mdx* 小鼠骨骼肌中 dystrophin 蛋白的表达,然而 GF 并没有进一步促进 Pip5e-PMO 的活性。根据前期研究,GF 能够显著提高 50 mg/kg PMO 的作用效果,主要原因是 GF 在一定程度上恢复了 *mdx* 小鼠肌肉中线粒体的功能,进一步促进了肌肉细胞对 PMO 的摄取^[17]。而 Pip5e 作为细胞穿梭肽能够促进 PMO 进入肌肉细胞,从而促进 PMO 恢复 dystrophin 蛋白,在此基础上 GF 促进 Pip5e-PMO 的作用效果不能凸显,但是肌肉的病理状态和线粒体功能是否有进一步的变化还不得知,需要在后续的实验中做进一步研究。

由于心肌中 dystrophin 蛋白的缺失,大部分 DMD 患者最终死因都是心力衰竭^[22],因此通过恢复 DMD 患者心肌中 dystrophin 蛋白来改善其心肌功能至关重要^[23]。据报道 GF 能显著促进 *mdx* 小鼠全身骨骼肌 PMO 的摄取及跳读活性,但在心肌中未检测到 dystrophin 蛋白的表达^[17],因此在本研究中检测 Pip5e-PMO 联合 GF 处理心肌中 dystrophin 的恢复情况成为必要。根据实验结果发现 Pip5e-PMO 在心肌中恢复 dystrophin 的作用效果能达到 12.5%以上,这为恢复 DMD 患者心肌中 dystrophin 蛋白的

表达奠定了基础。在 Pip5e-PMO 系统给药剂量为 15 mg/kg 的情况下,生理盐水组和GF 处理组骨骼肌中,dystrophin 蛋白的表达量均在 50%左右,而在心肌中,该剂量的 Pip5e-PMO 恢复 dystrophin 蛋白水平较低,12.5%左右,出现相同剂量 Pip5e-PMO 在骨骼肌和心肌中恢复 dystrophin 蛋白表达水平不一致的现象,推测可能的原因是核酸药物在心肌中发挥功效需要的剂量要高于在骨骼肌中发挥同等功效所需的剂量^[24]。因此在后续研究中,需要对 Pip5e-PMO 使用剂量做进一步的优化,以期在最小剂量下最大程度地恢复 dystrophin 蛋白的表达,从而为 DMD 的治疗提供依据。

参考文献:

- [1] Wilton S D, Veedu R N, Fletcher S. The emperor's new dystrophin: finding sense in the noise[J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(7): 417
- [2] Van Der Pijl E M, Van Putten M, Niks E H, et al. Low dystrophin levels are insufficient to normalize the neuromuscular synaptic abnormalities of mdx mice[J]. *Neuromuscul Disord*, 2018, 28(5): 427
- [3] 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
- [4] Guiraud S, Aartsma-Rus A, Vieira N M, et al. The pathogenesis and therapy of muscular dystrophies[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015, 16: 281
- [5] Aminzadeh M A, Rogers R G, Fournier M, et al. Exosome-mediated benefits of cell therapy in mouse and human models of duchenne muscular dystrophy[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 942
- [6] Xu R, Jia Y, Zygmunt D A, et al. rAAVrh74.MCK.GALGT2 protects against loss of hemodynamic function in the aging mdx mouse heart [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(3): 636
- [7] Ho P P, Lahey L J, Mourkioti F, et al. Engineered DNA plasmid reduces immunity to dystrophin while improving muscle force in a model of gene therapy of Duchenne dystrophy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(39): E9182
- [8] McDonald A A, Hebert S L, Mcloon L K. Sparing of the extraocular muscles in mdx mice with absent or reduced utrophin expression: A life span analysis[J]. *Neuromuscul Disord*, 2015, 25(11): 873
- [9] Pisani C, Strimpakos G, Gabanella F, et al. Utrophin up-regulation by artificial transcription factors induces muscle rescue and impacts the neuromuscular junction in mdx mice[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(4 Pt A): 1172
- [10] Kole R, Krieg A M. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87: 104
- [11] Welch E M, Barton E R, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations[J]. *Nature*, 2007, 447(7140): 87
- [12] Fairclough R J, Bareja A, Davies K E. Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Exp Physiol*, 2011, 96(11): 1101
- [13] Lim K R, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 533
- [14] Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study[J]. *The Lancet*, 2011, 378(9791): 595
- [15] Gao X, Ran N, Dong X, et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(444). pii:eaat 0195.doi:10.1126/scitrans-lmed.aat0195
- [16] Yin H, Saleh A F, Betts C, et al. Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(7): 1295
- [17] Han G, Gu B, Cao L, et al. Hexose enhances oligonucleotide delivery and exon skipping in dystrophin-deficient mdx mice[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10981
- [18] Korinthenberg R. A new era in the management of Duchenne muscular dystrophy[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2019, 61(3): 292
- [19] Klein S M, Prantl L, Geis S, et al. Circulating serum CK level vs. muscle impairment for in situ monitoring burden of disease in Mdx-mice[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2017, 65(4): 327
- [20] Lewon M, Peters C M, Van Ry P M, et al. Evaluation of the behavioral characteristics of the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy through operant conditioning procedures [J]. *Behav Processes*, 2017, 142: 8
- [21] Aartsma-Rus A, Straub V, Hemmings R, et al. Development of exon skipping therapies for duchenne muscular dystrophy: a critical review and a perspective on the outstanding issues[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2017, 27(5): 251
- [22] Burns D P, Canavan L, Rowland J, et al. Recovery of respiratory function in mdx mice co-treated with neutralizing interleukin-6 receptor antibodies and urocortin-2[J]. *J Physiol*, 2018, 596(21): 5175
- [23] Mosqueira M, Zeiger U, Forderer M, et al. Cardiac and respiratory dysfunction in Duchenne muscular dystrophy and the role of second messengers[J]. *Med Res Rev*, 2013, 33(5): 1174
- [24] Malerba A, Thorogood F C, Dickson G, et al. Dosing regimen has a significant impact on the efficiency of morpholino oligomer-induced exon skipping in mdx mice[J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(9): 955

(2018-12-29 收稿)