

靶向编辑长寿基因 让老弱血管“Q弹爽滑”

本报记者 张佳星

据说人体内的血管首尾相接长度可达10多万公里,血液每天在其间奔跑,有的是“高速路”,有的是“国道”,有的又是“乡间小路”。“新路”往往平滑顺畅、畅通无阻,“老路”往往会坑坑洼洼、磕磕绊绊,有没有可能通过生物技术的手段对“老路”进行修补呢?

日前,《细胞干细胞》杂志在线发表了中国科学院生物物理研究所刘光慧研究组、北京大学汤富酬研究组和中国科学院动物研究所曲静研究组的联合研究成果——通过靶向编辑单个长寿基因获得首例遗传增强的人类血管细胞。

“我们在人胚胎干细胞中进行基因编辑操作,对编辑后的干细胞进行定向分化,可在实验室中获得人类血管内皮细胞(血管内膜)、血管平滑肌细胞(血管中膜)及间质细胞(血管外膜)。”论文通讯作者之一的中国科学院生物物理研究所研究员刘光慧介绍,遗传增强的人类血管干细胞有望成为老弱血管“修补剂”,帮助修复衰老及受损血管,未来可能被应用于心肌梗死、缺血性中风等疾病的治疗中。

腺病毒载体介导 选用“非主流”编辑器

提到基因编辑,CRISPR/Cas9技术名声在外,它与ZFN、TALEN技术并称为基因编辑“三大利器”。但此次选用的基因编辑技术却并不是其中之一,而是被称为辅助病毒依赖的腺病毒载体(HDAAdV)介导的基因编辑技术。

这个一口气读不下来的名字需要拆分来理解。腺病毒载体是这款“基因编辑器”有效的核心,它像被细胞“吞”进去,并不会止步于细胞质,却能够进入到细胞核中,因为要对基因进行编辑、改写、擦除等操作,必须走进基因的“大本营”细胞核中。

然而腺病毒载体在染色体外,并不整合进入宿主细胞基因组中,这样不会对人类基因组造成损伤。

“我们使用的是第三代腺病毒载体,缺失了腺病毒的基因组序列,因此大大降低了病毒载体的毒性。”刘光慧说,可以理解为,经过技术改造,只保留了腺病毒“装卸货”的功能,而它的病毒特性已经完全摒弃了。

当“HDAAdV腺病毒”货车携带的DNA

同源重组序列进入细胞核后,会自动完成基因组靶序列的搜索和置换工作。“HDAAdV技术完全利用超大片段DNA同源重组的原理进行基因编辑,一般不会造成如CRISPR/Cas9一样的脱靶效应。”刘光慧介绍,它可携带长达25-37kb的超长DNA片段进入人类细胞核,置换基因组的固有片段,进而实现高效精准的基因编辑。

技术越用越纯熟,刘光慧研究组对HDAAdV技术的应用研究已经积累多年。早在2011年,刘光慧等利用HDAAdV基因编辑技术首次在人类疾病干细胞中实现了致病基因突变的高效精准矫正。研究组研究生颜鹏洋接受采访时表示,CRISPR/Cas9技术才刚刚问世,尚没有在人细胞中应用时,实验室已经熟练利用HDAAdV技术矫正或敲入了若干种人类致病基因突变。同时也多番证明HDAAdV基因编辑技术的安全性,相关文章发表于《自然》《科学》《细胞》和《细胞干细胞》等杂志。2017年,研究组更是通过HDAAdV技术产生了国际上首例遗传增强的人类间充质干细胞。

培育单倍体干细胞 找寻生命树成长“钥匙”

第二看台

本报记者 孙玉松 通讯员 吴军辉

胎盘是维持胎儿生命的重要器官,被誉为“生命树”。日前,南开大学药物化学生物学国家重点实验室师颖团队利用可诱导过表达转座因子CDX2的方式在体外获得单倍体滋养层干细胞,该新型单倍体干细胞只有一套基因组,可在体外无限增殖并具备分化成为胎盘谱系各种细胞的潜能。因此该研究犹如找到了生命树成长发育的“钥匙”,为胎盘发育、功能分析及胎盘疾病的致病机制研究提供了理想的体外模型,相关论文发表于细胞出版社旗下《整合科学》杂志。

单倍体细胞没有基因“备份”

“真核生物的遗传信息一半来自于父本一半来自于母本,因此自然情况下细胞中具有两套染色体,这也是哺乳动物传递遗传信息的方式,并通过减数分裂的方式抵御环境变迁,保障物种繁衍。但是对于遗传学研究尤其是隐性遗传基因功能的探索,二倍体细胞往往由于存在等位基因

而受限。”师颖教授向科技日报记者介绍说,“两套染色体相当于‘双保险’,如果对其中一个基因进行调控,由于存在对应的等位基因‘备份’,使得被改变的基因不能立刻突显功能。然而,只有一套染色体的单倍体细胞,没有基因‘备份’,我们对任意基因的更改,都会瞬间带来表型的改变。这对于我们探索生命现象、破解基因密码十分有利。”

据师颖介绍,自2011年以来,小鼠和人类等哺乳动物的单倍体胚胎干细胞系相继被顶级科技期刊报道过,然而,对于胎盘发育格外重要的胚外谱系的单倍体细胞系目前尚无报道。“我们这次实验是用小鼠完成的。”论文第一作者、南开大学药学院博士彭柯力介绍说,小鼠胚胎发育到桑椹胚后,桑椹胚进一步发育,细胞发生第一次命运决定,分化为两类细胞。聚集于胚胎一端且处于内部的个体较大的细胞群,称为内细胞团(简称ICM),其具有发育全能性,能够发育成胎儿的各种组织;而沿着透明带内壁扩展和排列的细胞群称为滋养层外胚层(简称TE),未来发育成胎膜和胎盘组织。

在适宜的体外培养条件下,可以从桑椹胚

编辑FOXO3基因 它是长寿界“名门闺秀”

工欲善其事,必先利其器。有了趁手的技术和精巧的技艺,要使得血管细胞“年轻化”,应该对哪段基因实施编辑呢?

“FOXO3是最保守的、也是公认的与长寿相关的基因。”刘光慧说,FOXO家族是一类转录因子,在上世纪90年代,科学家发现FOXO家族同源蛋白可能参与了动物寿命的调控。

随着研究的深入,科学家们发现FOXO3基因与人类长寿的确相关。更进一步的研究精细到单个核苷酸。基本思路是,将百岁长寿老人群体的FOXO3基因与平均寿命78.5岁的老人对比,找到这个区域内的核苷酸变异,逐步缩小与长寿直接相关的位点范围。更进一步的研究表明,许多国家地区的人在FOXO3基因中都能找到长寿相关的核苷酸变异。

研究组决定对FOXO3基因进行编辑,还

由于它能发挥“一石二鸟”的作用。干细胞应用于人体其实有着很高的难度,犹如平衡“跷跷板”,干细胞的状态必须恰到好处,如果太“疯狂”可能成为肿瘤,如果太“弱小”有可能由于是外来细胞被机体消灭。

“研究发现,FOXO3具有维持血管稳态的功能。”刘光慧说,它本身是一个转录因子,能激活下游的多个细胞保护的信号通路,FOXO3的活化还可通过诱导抑癌基因表达抵抗肿瘤形成,因此选择FOXO3能同时提高细胞治疗的效率和安全性。

为了证明这一点,研究组还将多种致癌因子导入了遗传增强的血管细胞中,发现它也可以有效抵抗癌基因诱导的细胞恶性转化,这大大降低了利用这些细胞进行治疗的安全隐患,使得干细胞向临床应用迈向了坚实的一步。

是“节流”不是“开源” 调控细胞运转“管理层”

FOXO3基因编码的FOXO3蛋白,实质是一种转录因子。它的工作地点是细胞核内,通过与基因的特定序列专一性结合,保证基因表达“有秩序”“有规律”。形象地说,它们是细胞生命运转中的“管理层”。

细胞内部对“管理层”也有“弹劾”制度。在一定状态下,比如细胞感到“吃饱喝足”了,就会通过PI3K/AKT通路磷酸化修饰FOXO3蛋白,让这种蛋白打上磷酸化的“标签”,随后这些FOXO3蛋白就被“夺权”了,活性被抑制,最终“下台”被请出细胞核。

“了解了这样的调控机制,我们选择了‘节流’而不是‘开源’。”刘光慧说,为了对基因组改动最小,研究组并不增强FOXO3基因表达,而是通过2个碱基的置换保证FOXO3蛋白不被“弹劾”而且“连任”。

“我们使用HDAAdV介导的基因编辑技术

置换了人胚胎干细胞中FOXO3基因的第3号外显子中的两个单核苷酸,使FOXO3蛋白转录因子不能有效地被AKT磷酸化,从而抑制了FOXO3蛋白的磷酸化和降解,促进FOXO3在细胞核内的聚集进而激活下游“有益”靶基因的表达式。通过对人类基因组中的两个核苷酸进行精准替换,最大限度地保持了人类基因组的完整性。”刘光慧说。

经过基因编辑的干细胞被定向分化为不同的遗传增强型人类血管细胞后,进行了相关动物实验。实验表明,小鼠腿部大动脉血管处被人为结扎后,向腿部输送血液的道路就被封住了。把遗传增强的血管细胞注射到腿部后,与注入未经过遗传增强的未经基因编辑的血管细胞的对照组相比,前者有着更强的自我更新、抵抗氧化损伤及延缓细胞衰老等能力,可高效促进受损血管再生,迅速恢复缺血部位血流。

这一问题,确保了单倍体TSCs在长期体外培养过程中维持单倍性,凸显了其在胚外组织中的遗传学筛选优势。”师颖说。

据介绍,这次获得的单倍体TSCs不仅可以在体外分化成胎盘谱系的各种细胞,也能在体内模拟胎盘发育(产生出血灶)。

为了验证单倍体TSCs“基因筛选利器”的判断,师颖团队借助转座子系统高效引入基因突变,并成功筛选出了海绵滋养层细胞的限制基因——HTRA1。“正常的单倍体TSCs可以分化为出血灶、合体滋养层、海绵滋养层、滋养层巨细胞等。HTRA1相当于一个‘闸门’,敲除它使得滋养层干细胞更多地定向分化到海绵滋养层,大幅度提高海绵滋养层的分化效率。”

与师颖团队论文发表同一天,中科院动物研究所周琪院士、李伟研究员团队还于《细胞报告》在线发表研究论文,也从发育能力到组学等多方面论证了单倍体滋养层干细胞是一类真正的具有胚外发育潜能的单倍体细胞系。“未来,我们或许也可以利用单倍体滋养层干细胞找到影响胎盘发育或者导致胎盘疾病发生的药物作用靶点,从而更好地促进胎盘正常发育。”师颖说。

封面故事

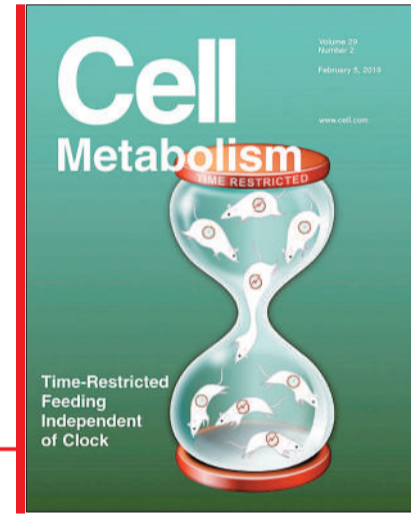
预防血栓和癌症转移 血小板诱饵



《科学·转化医学》
2019.2.13

血小板对体内平衡起关键作用,但血小板活化也会导致心脏病和癌症等多种疾病。虽然科学家们已经研发出血小板抑制剂,可是让活化的血小板逆转起来特别缓慢,使用过程中大大增加了风险。美国哈佛大学威斯生物启发工程研究所的安妮-洛尔等研究人员,通过修饰人类血小板,找到了一种没有药物的快速可逆抗血小板疗法。这种修饰过的小血小板被称为血小板诱饵,可以防止兔子血栓的形成,还可以通过预防癌细胞外渗来减少乳腺癌小鼠模型的转移形成。结果表明,血小板诱饵可能是治疗血栓形成和癌症转移的一种有效方法。

限时喂食让代谢稳定 生物钟突变后



《细胞代谢》
2019.2.5

生物钟突变的小鼠对代谢疾病的易感性增加,这导致了一种观点,即生物钟对于代谢稳态是必需的。美国索尔克生物研究所的阿芒迪娜·查克斯等研究人员发现,当缺乏生物钟的小鼠被随机提供食物时,体重迅速增加,并表现出基因型特异性代谢缺陷。然而,在限时喂食的情况下,喂食相同的饮食(黑暗期食物供应限制在10小时内)时,它们可以免受体重过度增加和代谢疾病的影响。转录组和代谢组分析显示,限时喂食降低了肝脏脂质积累,增强了细胞对代谢应激的防御能力。这些结果表明,生物钟通过维持每日进食和禁食的节奏,以及维持营养和细胞应激反应之间的平衡来维持代谢稳态。

形成语义与情景记忆 激活两个不同脑区



《神经科学》
2019.2

适应不断变化的世界对生存至关重要,我们的大脑特别适合记住不同于以往经历的事件。新奇的经历诱导海马体中的多巴胺释放,这是一个促进记忆持久性的过程。虽然来自中脑腹侧被盖区(VTA)的轴突通常被认为是海马多巴胺的唯一来源,但最近的研究表明,蓝斑(LC)去甲肾上腺素能神经元可同时释放去甲肾上腺素和海马多巴胺,其中多巴胺也能促进记忆保留。加拿大蒙特利尔麦吉尔大学蒙特利尔神经科学研究所的艾德里安等研究人员提出,源自中脑腹侧被盖区和蓝斑区的投影属于两个不同的系统,它们可以增强对新事件的记忆。与过去经历有一些共同之处的新奇经历会激活中脑腹侧被盖区,并通过系统记忆巩固促进语义记忆的形成。相比之下,那些与过去经历只有最小关系的经历会激活蓝斑区,从而在海马体中引发强烈的初始记忆巩固,形成生动而持久的情景记忆。

(本栏目主持人:陆成宽)

(本版图片除标注外来源于网络)

