

# 基因治疗又遇挫折 它还能“胜任”罕见病克星吗

本报记者 谢开飞

历经数十年的迂回与曲折,基因疗法为人类重大疾病特别是众多遗传缺陷性疾病的治疗带来了新希望。然而基因疗法最近又遭遇挫折。

近日,美国一家生物技术公司(Audentes Therapeutics)发布信称,参与公司“AT132”基因治疗的17名神经肌肉性罕见病儿童中,2名儿童在接受高剂量基因治疗后死亡。

## “缺啥补啥”,“纠正”突变的基因

在人体中,有个名叫“MTM1”的基因,它通过表达一个叫“肌管素”的蛋白,用于肌肉细胞的发育和维持。X染色体连锁肌小管性肌病正是由于“MTM1”基因突变导致的。

X染色体连锁肌小管性肌病主要影响骨骼肌,症状表现为肌无力和肌张力减退。肌肉病变会损害患者的坐、站和走等运动能力,甚至造成进食和呼吸困难,也可能导致眼肌麻痹、面部肌无力和肌反射消失。

目前,该疾病的主要治疗手段包括物理治疗以及使用呼吸机等支持设备。有研究表明,化学药物“吡啶斯的明”可能有利于改善临床症状,但还没开展正式的临床试验。总体而言,该疾病当前并无有效的治疗手段。

为此,科研人员开始探索采用基因疗法,“纠正”突变的基因。“基于‘缺啥补啥’的治疗逻辑,该基因疗法利用腺相关病毒(AAV)作为载体,将正常的‘MTM1’基因导入肌肉细胞用以产生正常功能的肌管素,从而修复受损肌肉细胞的功能。”中国科学院脑智卓越创新中心

## “升级”后的传输载体更安全

近年来,基因疗法发展迅速。曾经同样按下“刹车键”的事件发生在1999年,美国一位名叫杰西·基辛格的18岁患者,在腺病毒为载体

这种基因疗法的关键研究始于2017年,旨在治疗的是一种由单个基因突变引起的致命性疾病——X染色体连锁肌小管性肌病。该疗法原本打算在今年提交申请,期望年底获得美国食品药品监督管理局批准,但是计划现在被搁置。

20年前也曾有儿童在接受基因治疗时死亡,当时的基因疗法与这次的基因疗法有哪些不同?经过几十年的发展,基因疗法有了哪些改善,还面临哪些问题?就此,科技日报记者采访了有关专家。

仇子龙研究员介绍说,这属于“治本”的治疗方法,理想状况下甚至可以实现“一次治疗,终生获益”。

这一“纠正”过程如何实现?“整个过程和‘打点滴’很像。”仇子龙指出,研究人员将装载着正常“MTM1”基因的腺相关病毒注射进患者的血液,通过血液循环将腺相关病毒载体送达肌肉细胞,并在其中产生具有正常功能的“肌管素蛋白”。

在这些儿童参与临床试验之前,该基因疗法进行过临床前研究,包括在体外培养的细胞和小鼠疾病模型中验证该疗法的安全性和有效性,这种疗法总体上是安全的。

但为了提高治疗效果,研发人员测试了更高的基因疗法剂量。“高剂量对于神经肌肉疾病特别重要,因为需要更多基因拷贝通过血液循环到达靶组织。”华东理工大学大学生物工程学院程诚博士说,此次基因研究所用的剂量是基因治疗中的最高剂量:每千克体重300万个基因组拷贝。

的基因治疗临床试验中不幸去世。

当时,研究人员将腺病毒作为载体,将基因插入病人的细胞来替换那些丢失或功能失

调而导致疾病的部分。几天后,杰西因为严重免疫反应导致多器官衰竭死亡,这给最初对基因疗法持乐观态度的人浇了一盆冷水。

杰西·基辛格因基因治疗死亡的悲剧发生后,研究人员便缩小了实验室的规模,将精力放在了寻找更加安全的病毒载体上,最终他们发现并推广使用了腺相关病毒。

腺相关病毒是目前发现的一类结构最简单的单链DNA缺陷型病毒。腺相关病毒基因疗法,以腺相关病毒作为载体,将治疗性基因输送到特定的组织和器官中,这些治疗性基因在这些非分裂细胞中以游离体形式稳定存在并表达,从而有效治疗单基因遗传病。

目前,腺相关病毒是较为主流的基因治疗

## 过高剂量易产生毒副作用

对于基因疗法存在的不安全性,程诚认为,以此次“AT132”基因疗法的案例来说,儿童死亡的原因可能是接受了过高剂量的腺相关病毒静脉注射,由此产生了大量的对于腺相关病毒的抗体。病毒和抗体的结合可以进一步激活补体通路或先天免疫反应,从而引发强烈的毒副作用。

“另一种不安全性表现为正常基因的错位表达。”程诚以脊髓性肌萎缩症的基因疗法“Zolgensma”为例说,静脉注射会导致“Zolgensma”携带的正常基因在肝脏中过度积累,但这个基因在肝脏中并不发挥功能,由此引发了治疗后比较普遍的肝毒性,表现为转氨酶的升高。

早在数年前,基因治疗领域先驱、腺相关病毒研发者之一的美国科学家詹姆斯·威尔逊,曾对基因治疗中使用的高剂量载体表示过担忧。2018年2月,威尔逊团队发表论文称,高剂量腺相关病毒注射后,引发恒河猴和仔猪的严重毒性反应,其中一只恒河猴由于肝脏衰竭不得不接受安乐死。为此,威尔逊呼吁研究人员进行基因治疗时应仔细监测类似的毒性作用。

威尔逊的合作者、美国麻省理工学院医学院高光谱教授也曾表示过类似的想法,他在

载体平台,也有用腺病毒和慢病毒的基因疗法。仇子龙指出,相比于腺病毒,腺相关病毒载体具有安全性高、免疫原性低、疗效更长和便于改造等优势,新发现的AAV8、AAV9等腺相关病毒将基因转入细胞中的能力比腺病毒强10—100倍。而慢病毒则具有随机整合基因组的特性,存在破坏正常基因功能的潜在风险。

除了此次报道的单基因突变引发的罕见病,当前国内外基因疗法也有用于治疗帕金森病、阿尔兹海默症、癌症等其他复杂疾病。当前,约有42家公司、近100个药物研发项目使用腺相关病毒载体进行基因治疗。此次死亡事故中,研究人员用于基因治疗的载体便是AAV8。

2019年接受采访时曾表达过担心:这个领域发展太快会让人们变得不那么谨慎,可能会让杰西·基辛格这种事情再次发生。

“科技进步都会经历挫折。”仇子龙表示,虽然这次高剂量基因治疗造成了患者的死亡,但也不能否认基因治疗的有效性。面对单基因罕见病缺少有效治疗手段的现实,基因治疗确实为许多患者和他们的家庭带来了希望。当前,基因治疗还有许多不足之处,这需要领域内的专家学者不断改进和完善,使其更加安全有效,而不应该因噎废食。

在推动基因治疗领域发展方面,仇子龙建议,需要不断改造从而获得新的、具有特殊组织亲和性的腺相关病毒类型,降低注射后人体的免疫反应,实现对正常基因的更精准递送,进一步降低毒副作用;同时,研发更优的基因调控元件,使递送到患者体内的正常基因可以“适时适地适量”地产生有功能的蛋白。

程诚也建议,可以进一步优化腺相关病毒的生产与纯化工艺,降低病毒中的杂质,提高纯度;选择更优的载体递送模式,例如针对神经系统的疾病,可以采用鞘内注射或脑室注射的载体递送模式。

# 光敏蛋白施援手,科学家可定时定点重组基因

本报记者 张佳星

在《水浒传》中,宋江在祝家庄用一盏高悬的红灯笼指挥人马,取得了胜利。华东师范大学生命科学学院研究员叶海峰团队近日以通讯作者身份在《自然·通讯》杂志发表论文称,他们开发了一种用远红光调控的分割型Cre-loxP重组酶系统。这种融入了光控系统的重组酶,能够像祝家庄部队一样在LED远红光照射的地方启动“战斗”,不仅实现了对基因重组的有效控制,还解决了此前困扰学界很久的生物学毒性、组织器官特异性、组织穿透性差等问题。

## 基因功能研究利器却自带“痛点”

自人类基因组计划实施以来,人类虽然读出了传递“生命密码”的基因组序列,但并不清楚每个基因的功用。

为了破译基因的功能,人们通过让该基因失活,看生物体内发生的变化,或者直接把该基因敲入到模型动物中,看试验动物发生的变化,进而研究一个基因在生命活动中的具体功能。

在Cre-loxP重组酶中,loxP序列有34个碱基对,由两端回文的各13个碱基对和中间8个非

对称碱基对组成。而Cre重组酶能够对loxP序列进行特异性识别,因此Cre-loxP重组酶被誉为基因编辑神器,可以对特异位点的基因进行包括敲除、插入、翻转和易位等定向改造。

Cre-loxP重组酶系统虽然好用,但是问题来了。Cre重组酶是1981年从P1噬菌体中发现的,它不是哺乳动物与生俱来的。loxP序列也来源于P1噬菌体。“持续稳定地表达Cre重组酶会导致早期胚胎致死问题,不利于后续基因功能的研究。”叶海峰对科技日报记者解释,另一方面,长期表达Cre重组酶也会对细胞造成一定的毒性,导致染色体的重排和细胞生理功能的紊乱。

也就是说,如果小鼠在全生命周期都表达这个外来的Cre重组酶,要么“短命”,要么“生病”。科学家用动物模型研究某个基因的功能时,空间非常有限,效果也可能不理想,在应用中产生了“痛点”。

## “智能线路”满足基因改造定制要求

在此次发表的论文中,研究团队利用该课题组前期开发的远红光调控的哺乳动物细胞转基因表达控制系统,将4个主要元件拼接组装,完

成了远红光到重组酶“开关”的信号通路建设。“经过这样的改造,基因重组不仅可以在时间上受控,还可以在空间上受控,从而实现生命科学中的‘定制’需求。”叶海峰说,“比如,有些基因的全身性敲除是致命性的,那就不能持续研究,现在如果用光来控制基因的定点敲除,就可以研究这类关键基因的功能。”

加了“智能线路”的系统设计完成后,叶海峰团队用“3步走”的实验严谨地对整个程序进行了测试。叶海峰说,对人胚胎肾细胞的测试最开始不理想,但通过优化启动子、质粒量等参数,最终获得了最优解。

随后,研究团队分别在哺乳动物细胞中、小鼠体内进行测试后显示,重组系统在远红光照射下有较高的重组效率。小鼠活体成像和肝脏成像显示,与黑暗组小鼠相比,光照组小鼠荧光蛋白表达量更高。

## 一个来自微生物的蛋白堪当大任

祝家庄的红灯笼大战,靠的是人眼对红光的识别。而在生命科学的光控体系中,让生命活动与光“攀上关系”的是一种名为BphS的光敏蛋白。人类一直希望从体外精准控制基因表达,早

期希望通过化学小分子达成,形象地表述就是“用点药”“加点料”。

“我觉得小分子控制可能意义不大,因为化学分子一加进去就失去局部控制效果。”叶海峰认为,用光来控制基因的表达则不同,能够实现精准控制。

说到光,最先想到人眼睛的视网膜中的蛋白,因为人眼对光有感应。因此,叶海峰最先研究的是人视网膜中的光敏蛋白,但这种蛋白天生对特定频率的光敏感,而这些频率的光透皮效果差。“为了找到好用的光敏蛋白,我们从文献中‘大海捞针’,从一些文献报道中发现微生物、植物里的远红光响应蛋白,可用光的范围更加广泛。”叶海峰说,后来有学者从微生物里鉴定找到了BphS,就是我们现在用的光敏蛋白。

“我们根据蛋白的一些功能特性,将光敏蛋白从红细菌中转移到哺乳动物体系,让其仍旧能够工作。”叶海峰说,他们设计了很多策略,通过合成生物学理论组装拼接各种部件,组装成不同的基因回路。

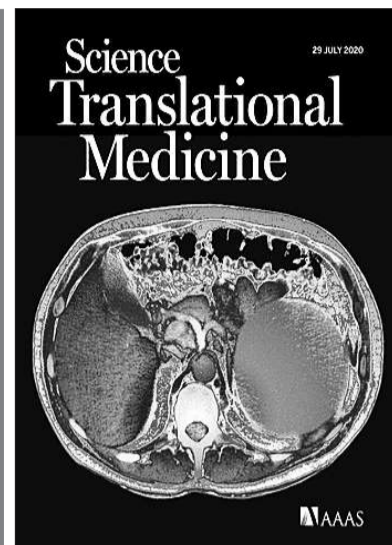
叶海峰表示,未来,“光控”基因调控系统可能会更加复杂。比如用蓝光、红光、紫光传递不同信号,进而实现多色光的控制,同时通过加入逻辑运算,控制更加复杂的细胞行为。

## 封面故事

主持人:本报记者 陆成宽

### 治疗这种常见遗传病 抗氧化蛋白提供新方向

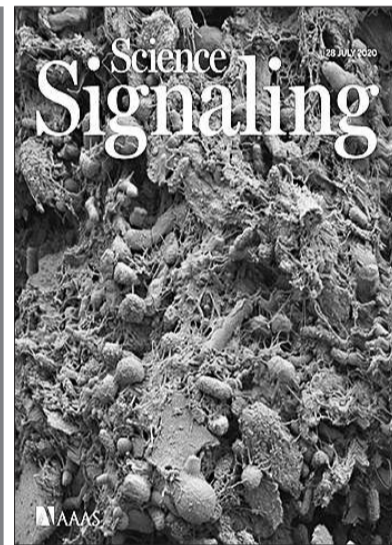
《科学·转化医学》  
2020.7.29



常染色体显性多囊肾病(ADPKD)是一种较为常见的遗传性疾病,其发病机制尚不完全清楚。通过对人类患者和小鼠模型的研究,天津医科大学的卢毅(音译)等研究人员发现抗氧化蛋白NRF2失活突变在该疾病的发病过程中发挥了关键作用。除了阐明疾病发生的机制,研究人员还通过小鼠模型证明,与NRF2通路相关的药物能减缓这种疾病的进展,这表示,该研究为人类常染色体显性多囊肾病患者治疗提供了潜在的方案。

### 食用益生菌 可调节肠脑双向通讯

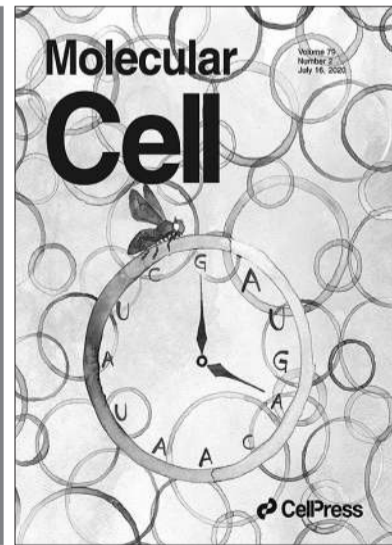
《科学·信号》  
2020.7.28



肠道菌群除了在宿主代谢和免疫调节中发挥重要作用外,在中枢神经系统和肠道神经系统之间的双向通讯系统——肠脑轴中也发挥着重要作用。中国国家蛋白质科学中心(北京)的张培(音译)等研究人员对喂食两种不同益生菌的小鼠的脑肠和肠道微生物群进行了分析。结果发现,益生菌改变了许多神经肽的丰度,其方式与肠道微生物群组成的变化有关,因脑区而异,并取决于益生菌种类。益生菌是活的还是灭活的,以及食用益生菌的时间长短。这些组学数据集为将来研究肠道微生物群与神经肽控制的认知、行为和生理过程之间的关系奠定了基础。

### 果蝇模型研究发现 环状RNA能延长寿命

《分子细胞》  
2020.7.16



环状RNA在不同物种的神经元中大量存在,并随着年龄的增长而积累。然而,虽然少数环状RNA的功能被确认,但它们在衰老过程中的作用尚未被揭示。德国马克斯·普朗克衰老生物学研究所的玛丽安·魏格尔特等研究人员,使用衰老过程中的转录组分析发现,在长寿的胰岛素突变果蝇中环状RNA的积累在减缓。研究团队还发现一种名为circSrl的特殊环状RNA,其行为与其他环状RNA有所不同。与正常果蝇相比,缺乏胰岛素的长寿果蝇中circSrl表达水平更高。此外,过表达circSrl时,这些果蝇的寿命也会延长。这些发现表明,circSrl不仅依赖于胰岛素发挥作用,还可以直接影响果蝇寿命。