《细胞报告》：从“体内”唤醒“寂静”的基因

作者：writer 来源：爱科学

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/19211.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

《细胞报告》：从“体内”唤醒“寂静”的基因。听力残疾位居我国各类残疾之首，其中60%的耳聋由遗传因素引起。基因治疗是治疗基因突变导致的遗传性耳聋的金钥匙，尤其是针对DNA的基因修复，更是被给予治本的希望。

7月12日，《细胞报告》发表了北京脑科学与类脑研究中心研究员（原清华大学生命学院副教授）熊巍团队与合作者的最新进展，他们首次在哺乳动物模型上展示了利用非同源末端连接（NHEJ）的基因修复通路有效实现先天性遗传疾病的在体基因治疗。

从治标到治本

据世界卫生组织官网数据，全球大约有4.66亿人患有残疾性听力损失，其中儿童约为3400万。

临床上对于遗传性耳聋的治疗，主要是植入人工耳蜗和佩戴助听器，以及化学药物治疗，但这些都不能从根本上治疗耳聋。

基因药是继化学药之后的基础和临床各机构研发的下一代药物的重点方向，在人体基因递送和基因表达等技术门槛陆续解决的情况下，遗传性疾病的基因治疗的前景越来越明确。

虽然基因治疗被看作治疗基因突变导致的遗传性疾病的救星，但目前大部分研究工作集中在针对mRNA的基因替代或者基因沉默。

熊巍在接受《中国科学报》采访时说，基于mRNA的基因治疗，虽然若干适用性好的靶基因已经被用于临床，体现出基因治疗的可行性，但就中心法则而言，在mRNA水平的修复还是治标不治本，针对DNA的基因修复是下一代基因治疗的新方向。

他解释说，DNA好比是生命的源代码，mRNA等是由DNA转录的产物，就遗传突变导致的疾病而言，针对mRNA的基因替代或者基因沉默只是对产物的治疗。其中基因替代主要是对突变基因做加法，把原突变基因导致功能丧失，通过外源补充野生型基因来替代；基因沉默则是做减法，把致病突变基因消除掉。

在他看来，针对mRNA的基因治疗不受身体内源调控，具有瞬时性，超过一定时效就会失效。

面向DNA的基因编辑带来的基因修复，可以让被修复基因跟随生命体的生长节奏在时间上和空间上实现内源表达调控，是最自然的基因表达和调控的体现，也是最理想的针对遗传性疾病的修

复方式。熊巍说。

经过近7年的研究，熊巍团队终于提出了特别针对DNA移码突变的一个方案，并系统展示了在耳蜗毛细胞DNA水平的基因编辑有效恢复动物听觉。

他们还在体外组织和在体动物两个层面，从编辑基因产物、蛋白表达、毛细胞功能、以及动物生理功能等多个角度的分析和评估来展现该方案的可行性。

从体外走向体内

近年来，越来越多的科研工作者投身基因编辑技术的探索，但基于基因编辑技术的在体基因治疗方案一直处于实验室和细胞系体系研究阶段。

熊巍告诉记者，DNA水平的基因修复需要依靠CRISPR-Cas为代表的基因编辑技术，随着2011年CRISPR-Cas工具的开发成熟，研究者可以依赖guide RNA（gRNA）实现稳定可控的定点DNA双链切割/断裂（DSB）。

DSB的修复有很多通路，其中最主要的是非同源末端连接（NHEJ）和同源重组修复（HDR）两种。NHEJ产物携带各种插入或者缺失（InDel）导致的移码突变，它的结果等同于从一个突变到多种突变，因此没有得到基因治疗的很好应用。

而依赖HDR修复通路是将靶基因修复为野生型，但是这一过程需要有一个野生型的DNA模板，然而在体情况下基于HDR通路的修复效率在活体动物的终端分化细胞上效率非常低，这在一定程度上限制了基因编辑在基因治疗上的应用。

自2016年以来，陆续有基于细胞系的研究表明gRNA-spCas9酶切割产生的DSB的末端连接产物并非随机，而是可以预测和重复实现的。

基于这一原理，对于某一个gRNA所获得DNA编辑事件可以预测，反过来说，也可以根据DNA产物需要来选择gRNA。但是这个规律在体内的实际情况怎样还不知道。 熊巍说。

在这项研究中，他们利用一株模拟人类DFNB23遗传性耳聋的Pcdh15av-3j小鼠品系，全方位系统地展示了突变位点附近产生的DSB可以通过NHEJ通路实现移码突变的修复以及听觉和平衡觉功能的部分修复。

这项研究涉及组织和在体动物两个层面的验证。对于组织层面而言，耳蜗毛细胞的基因递送一直是一个难点。

2014年，熊巍团队开发了一套耳蜗组织培养和基因电转递送的系统解决方案，在此基础上，他们首先扫描了av-3j突变（1bp插入）上下游15bp的区域内的4条gRNA所产生的编辑产物，发现其中的m-3j-gRNA1表现出高比例的1bp删除的编辑产物，而且重复性很高，这意味着m-3j-gRNA1是一个潜在的治疗av-3j突变的备选gRNA。

在培养的Pcdh15av-3j耳蜗组织上，他们又通过电转表达了spCas9和m-3j-gRNA1的Pcdh15av-3j毛细胞可以恢复PCDH15蛋白的表达，同时Pcdh15av-3j毛细胞的机械转导功能也有所恢复。

论文的共同第一作者，已毕业的清华大学博士刘恋告诉记者，根据体外研究的效果，团队又进一步开展了在体动物层面的实验，对Pcdh15av-3j小鼠在体耳蜗注射包裹有m-3j-gRNA1的AAV2/9。

通过对电转耳蜗组织（体外）和病毒注射耳蜗组织（在体）的基因编辑产物进行的系统比对，发现它们无论是在主编辑产物还是产物的比例上均非常一致。

他们又进一步对m-3j-gRNA1病毒注射小鼠的各方面指标进行评估，包括耳蜗毛细胞的PCDH15表达、耳蜗毛细胞的机械转导电流、小鼠的听性脑干电位和惊吓反应等，均显示单个m-3j-gRNA1在spCas9的帮助下即可实现av3j突变的功能性恢复。

这项利用小鼠耳蜗培养组织验证了终端分化的功能细胞上编辑产物也具有可重复性，并利用该原理实现了单个gRNA即可修复移码突变，实现小鼠的在体基因治疗。概念的成功验证提示了占人类22%的移码突变导致的遗传性疾病有广阔的治疗前景。

脚踏实地地推进科学研究

从2015年在清华大学成立神经通讯实验室，熊巍就开始带领团队研究耳聋相关基因的生理和病理机制，也经历了白手起家的不易。

除了所有的技术和资源要从零开始积累，期间更是尝试了各种策略和方法，最终锁定利用到NHEJ的非随机修复机制来重塑移码突变导致的致聋突变。



熊巍（左四）团队 受访者供图

今年，熊巍加入北京脑科学与类脑研究中心。他坦言，自己也曾设想过验证失败，体内是复杂的

环境，有些实验在体外很好，但到体内可能就完全变了，如果验证失败，那只能说推倒再来。

熊巍告诉记者，目前关于基因编辑在人体应用的政策还不明晰，主要是新技术的未知性，如何在规定范围内使用，并将可能危害降低到最小的探讨是非常必要的。

他透露说，除了移码突变，他们还在开展替换突变的组织和在体研究。接下来，如果条件允许，我们会进一步在猪和非人灵长类动物体内进行实验，并在符合政策的条件下，脚踏实地推进科学研究。熊巍说。（来源：中国科学报田瑞颖）

相关论文信息：https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111061

版权声明：凡本网注明来源：中国科学报、科学网、科学新闻杂志的所有作品，网站转载，请在正文上方注明来源和作者，且不得对内容作实质性改动；微信公众号、头条号等新媒体平台，转载请联系授权。邮箱：shouquan@stimes.cn。
作者：熊巍等 来源：《细胞报告》

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发