

对基因下手,彻底“唤醒”耳朵

● 本报见习记者 田瑞颖

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,更是被寄予“治本”的希望。

日前,《细胞报告》发表了北京脑科学与类脑研究中心研究员(原清华大学生命科学学院副教授)熊巍团队与合作者取得的最新进展。他们首次在哺乳动物模型上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

世界卫生组织官网数据显示,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、佩戴助听器以及化学药物治疗,但这些方法不能从根本上治疗耳聋。

基因药是继化学药之后下一代药物的重点研究方向。在人体基因递送和基因表达等技术陆续被攻克的情况下,遗传性疾病的基因治疗前景越来越明朗。

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于针对 mRNA 的基因替代或者基因沉默。

熊巍在接受记者采访时表示,在基于 mRNA 的基因治疗中,虽然若干适用性好的靶基因已被用于临床,体现出基因治疗的可行性,但就中心法则而言,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给突变基因做加法,通过外源补充野生型基因填补突变基因导致的功能丧失;基因沉默则是做减法,将致病突变基因消除。

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,熊巍团队提出了针对 DNA 移码突变的一个方案,并系统展示了耳蜗毛细胞 DNA 水平的基因编辑可有效恢复动物听觉。

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角度进行分析、评估,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开始探索基因编辑技术,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体系研究阶段。

熊巍告诉记者,DNA 水平的基因修复需要依靠以 CRISPR-Cas 为代表的基因编辑技术,随着 CRISPR-Cas 工具的开发成熟,研究者可以依靠引导 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 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,不能很好地应用于基因治疗。

而依赖 HDR 的修复通路是将靶基因修复为野生型,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出现,而是可以预测和重复实现的。

“基于这一原理,可以预测某一个 gRNA 所获得的 DNA 编辑事件;反之,也可以根据 DNA 产物需要来选择



图片来源:摄图网

gRNA。但是这个规律在体内的实际情况如何还不清楚。”熊巍说。

在这项研究中,他们利用模拟人类 DFNB23 遗传性耳聋的 Pcdh15av-3j 小鼠品系,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 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,通过电转表达了 spCas9 和 m-3j-gRNA1 的 Pcdh15av-3j 毛细胞,恢复了 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。

论文共同第一作者、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。

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系统比对显示,它们无论是在主编辑产物还是产物的比例上都非常一致。

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的实验验证了在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。

脚踏实地推进科学研究

从 2015 年在清华大学成立神经通信实验室开始,熊巍就带领团队研究耳聋相关基因的生理和病理机制,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,其间他们更是尝试了各种策略和方法,最终锁定利用 NHEJ 的非随机修复机制来重塑移码突变导致的致聋突变。

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,因为体内是复杂的环境,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,主要是新技术存在未知性,因此关于如何在规定范围内使用,并将可能的危害降低到最小的探讨是非常必要的。

他透露,除了移码突变,他们还将开展替换突变的组织和在体研究。“接下来,如果条件允许,我们会在猪和非人灵长类动物体内进行实验,在符合政策的条件下,脚踏实地推进科学研究。”熊巍说。

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