

基因编辑·大家谈



梁立智

在现代生命科学与医学诊疗强劲发展的时代背景下,基因编辑技术正在以前所未有的速度重塑人类对遗传性疾病的干预范式。

碱基编辑的概念与用途

碱基编辑技术是一类兼具高特异性与高精度的基因编辑工具。其核心理念在于,将 CRISPR-Cas9 系统出色的 DNA 扫描与序列识别能力,与具有化学催化活性的脱氨酶巧妙结合。通过这种结合,碱基编辑器能在无需主动诱导 DNA 双链断裂的前提下,直接对目标基因组序列进行化学修饰,进而引入特定的单核苷酸多态性。这里所涉及的化学修饰主要表现为脱氨基作用,即从特定核苷酸上移除一个氨基,随后在细胞内 DNA 修复或复制的过程中完成新碱基的替换与安装。

相较于传统依赖 DNA 双链断裂的基因编辑手段,碱基编辑极大地降低了靶向位点产生异质性插入与缺失的概率、染色体畸变风险以及细胞毒性。

根据所能催化的化学转换类型,碱基编辑器主要分为两大基本类别:胞嘧啶碱基编辑器(CBEs)能够将胞嘧啶转化为胸腺嘧啶(C→T),实现 C·G 碱基对向 T·A 碱基对的转变;而腺嘌呤碱基编辑器(ABEs)则能将腺嘌呤转化为鸟嘌呤(A→G),完成 A·T 碱基对向 G·C 碱基对的替换。

此外,科学界还进一步研发了能够实现胞嘧啶向鸟嘌呤转换的 CGBEs,以及可同时进行腺嘌呤和胞嘧啶替换的双重碱基编辑器 ACBEs。从临床用途来看,在人类已知致病性单核苷酸变异中,G·C 突变为 A·T 的突变占相当比例,而 ABEs 可以将 A·T 碱

基对转回 G·C,能够逆转此类致病突变,因此在遗传性罕见病的临床矫正中蕴含巨大应用价值。

碱基编辑器的核心组分

从蛋白质工程视角来看,碱基编辑器是由两个具有特定功能的独立蛋白耦合而成的复合分子系统。这一重组复合体主要由多个核心功能模块协同构成。

作为定位与解旋核心的是 Cas9 切口酶(nCas9),它通过对天然 Cas9 核酸酶进行定点突变改造获得,仅能在 DNA 双螺旋的一条链上产生单链切口,从而规避了双链断裂带来的安全风险。

作为化学修饰催化剂的是核苷脱氨酶,它能够专一性地切除特定核苷上的氨基。融合胞嘧啶脱氨酶构成 CBE,而融合人工工程化改造的腺苷脱氨酶(如 TadA 变体)则构成 ABE。

此外,向导 RNA(gRNA)扮演着分子导航仪的角色,通过其间隔序列与目标位点互补配对,将 Cas9-脱氨酶融合蛋白精准锚定至靶区。当碱基编辑器与靶序列结合后,DNA 双链局部解旋并在非靶链上暴露出单链 DNA,脱氨酶便能在长约 5~10 个碱基对的碱基编辑窗口内对碱基进行化学修饰。在部分高级版本中,还会融合尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)等辅助组分以提升编辑效率。

碱基编辑的工作机理与演化

碱基编辑的运作包含定位、解旋与暴露、化学修饰以及修复整合四个连续过程。

首先,向导 RNA 引导 nCas9 复合物精准寻找并结合目标 DNA 序列。随后,Cas9 介导双链 DNA 解旋形成 R 环结构,将非靶链上的单链 DNA 暴露给脱氨酶。接着,脱氨酶在距 PAM 位点一定距离的 5~10 bp 窗口内实施脱氨基转化,将胞嘧啶转化为尿嘧啶,或将腺嘌呤转化为肌苷。最后,借助宿主细胞复制或修复机制,尿嘧啶(U)在 DNA 复制中被解读为胸腺嘧啶(T)并与腺嘌呤(A)配

对,肌苷(I)被解读为鸟嘌呤(G)并与胞嘧啶(C)配对,从而将原本的 C·G 或 A·T 碱基对分别最终替换为 T·A 或 G·C 碱基对。

在技术演进历程中,如何克服细胞内源性修复机制对编辑成果的撤销展现出了极高智慧。

第一代 CBE 面临严重的效率瓶颈,因为脱氨生成的尿嘧啶会被细胞碱基切除修复(BER)途径中的 UNG 酶识别切除,导致 C 到 T 编辑效率低且产生杂质。第二代 CBE 巧妙地融合了 UGI 蛋白强效阻断 UNG 对尿嘧啶的切除,成功将编辑效率和纯度提升了 3 倍。同时,细胞错配修复系统(MMR)也可能还原编辑产物。第一代 CBE 采用完全失活的 dCas9,无法调控修复偏向;直到 BE3 等新一代版本改用 nCas9 切口酶,特异性在未编辑链制造单链切口,诱导 MMR 以发生编辑的链作为修复模板,显著提升编辑产物的留存效率。

在 ABE 的发展中,科学家们克服了天然腺嘌呤脱氨酶仅能编辑 RNA 的障碍,通过定向诱变成功改造了大肠杆菌 TadA 酶,使其获得了编辑 DNA 的能力。由于细胞内不存在专用切除肌苷的糖基化酶,因此 ABE 无需像 CBE 那样融合 UGI 抑制剂,即可保持极高水平的编辑纯度与稳定性。

碱基编辑治疗的前沿实践

随着分子机制的完善,碱基编辑技术已快速从基础研究走向临床治疗阶段,并在多种重大疾病干预中展现出革命性前景。

在心血管疾病治疗领域,2022 年 8 月,Verve Therapeutics 公司启动具有里程碑意义的体内碱基编辑人体临床试验:借助脂质纳米颗粒(LNP)包裹编码 ABE 的 mRNA 与 gRNA 递送至肝脏细胞,通过碱基编辑精准破坏 PCSK9 基因的剪切位点使其失活,以期实现血清胆固醇长期下调。

在神经肌肉罕见病矫正方面,研究团队在细胞与小鼠模型中证实,对 SMN2 基因开展精准 A→G 碱基编辑

可以上调其功能性蛋白表达,从而显著改善因 SMN1 基因缺失突变引发的脊髓性肌萎缩症(SMA)的功能缺陷。

在细胞免疫治疗领域,科研人员利用碱基编辑器同时敲除 CD4⁺T 细胞的 CCR5 与 CXCR4 受体基因,使改造后的 T 细胞获得抵御 HIV 感染及再次感染的能力,为艾滋病的细胞治疗奠定了重要基础。

碱基编辑的技术局限

尽管碱基编辑优势显著,但在迈向广泛临床应用的过程中,依然面临着若干亟待突破的技术局限与挑战。

在基础定位与递送层面,由于碱基编辑器融合了多个蛋白质结构域,其整体尺寸相比常规 Cas9 显著增大,增加了包装进腺相关病毒(AAV)载体的难度,目前科学家正尝试利用拆分型蛋白拼接素系统来破解该瓶颈。

在编辑精准度层面,碱基编辑严格依赖 PAM 位点与目标碱基的相对距离,且窗口内若存在多个同类碱基可能引发非预期的旁观者编辑,需通过研发变体与缩窄编辑窗口来解决。

此外,编辑过程中仍会少量产生 indels(插入-缺失突变)等副产物,少数情况下也可能出现双链断裂事件,且脱氨酶结构域可能产生非依赖 Cas9 的 RNA 脱靶编辑,需通过蛋白质工程降低其对 RNA 的亲合力。

从粗放切割 DNA 双链的“分子剪刀”,到在单碱基本身进行化学重写的“精准微雕”,碱基编辑技术标志着遗传密码掌控能力的飞跃。尽管在递送效率、窗口精度及脱靶控制等方面仍有难关,但其在心血管疾病、罕见病及免疫治疗中的表现,已让我们看到了精准医学时代的曙光。随着技术演进,碱基编辑必将走向临床现实,为无数遗传病患者带来重生希望。

(本文系首都医科大学医学人文与全科医学院医学伦理学与医学史学系副教授梁立智根据 Manel Llado 发表于 CRISPR-Medicine News 的“Explainer: What Are Base Editors and How Do They Work?”翻译整理)