

观点

科学探索和医学未来

单分子技术与基因组学的邂逅

通往精准医学之路

Single Molecules Meet Genomics

Pinpointing Precision Medicine

谢晓亮 美国哈佛大学化学与化学生物学系,中国北京大学生物动态光学成像中心(BIOPIC)

过去20年来,单分子成像与操纵领域的进展迅速,孕育出了一门基于观测单个分子来理解生物过程的新学科——单分子生物学。在全世界许多实验室的推动下,这个崭新的领域改变了我们对于许多生物学问题的思考与理解,并产生出很多新知识。

一个早期单分子生物学的例子是我们对胆固醇氧化酶催化的研究¹。此酶含有的核黄素辅基在氧化态下是天然的荧光基团,而在还原态下则不发光。每一次荧光的“亮/灭”循环对应一个酶分子催化状态的翻转,从而使得对单个酶分子反应的实时观察成为可能。在单分子层面上,化学反应是随机发生的(即化学反应发生所需的等待时间是随机分布的),而不像在拥有大量分子系统中的反应那样有可被推测的结果。由于很多生物大分子(例如DNA)是以单分子或者少量几个分子的形式存在于细胞之中,能对单分子化学反应进行实时观察就尤为重要。

单分子酶学也具有实际应用意义。例如,单分子测序仪通过监测单个DNA聚合酶分子将有荧光标记的核苷酸逐个合成到一个单链DNA模板上的过程,以直接读取DNA分子的序列²。尽管单分子测序仪在成本、准确性和通量方面还不能与基于大量分子的DNA测序仪相竞争,但它的一个独特的优势是能够测很长的DNA序列。2007年以来基于大量分子(而不是单分子)的“新一代”DNA测序仪的出现,已开启了激动人心的个体化医疗的新纪元。

然而在基础研究领域,单分子生物学不仅在体外而且在活细胞内均增进了我们对许多大分子系统工作机理的深入

理解。一个基因在单个细胞中只有一个或者两个拷贝,基因表达的过程和单个酶分子反应一样,也是随机发生的。因此,单分子生物学与单细胞生物学是密切相关的。近年来,我们对单个活细胞中mRNA和蛋白质分子逐个产生的随机过程进行了详细的研究,从而使得分子生物学的“中心法则”在单分子层面上得到了定量的描述³。

DNA以单分子(单个染色体)的形式存在于每一个人体细胞中,所以基因组的变化也是随机发生的。相应的,人类生殖细胞分裂时发生的随机重组使得每一个细胞都不相同,而癌细胞中剧烈的基因组变化也使得原发肿瘤中的细胞之间存在高度的异质性。在一个细胞中最常见的基因组改变包括单核苷酸变异[SNV,一种单碱基对的点突变;基因拷贝数变异(CNV)]。在人类整个基因组的六十亿个碱基对中的一个特定的SNV就可能导致遗传性疾病;而CNV通常发生在生殖细胞分裂时的染色体分离过程中以及肿瘤细胞内基因组的重排错误(包括插入、缺失、染色体倒位和易位)。由于SNV和CNV在不同细胞中的发生是随机的、不同步的,因此每个细胞都拥有不同的基因组,这使得单细胞测序成为必需。而直到最近,由于单细胞基因组学的发展,这种必需才变得可行⁴。

给单个人类细胞做全基因组测序需要对其进行全基因组扩增(WGA)。新近发展的一种WGA方法——多重退火循环扩增法(MALBAC)⁵,可以比此前广泛应用的MDA方法更准确地检测SNV和CNV。MALBAC可以在人体细胞中数字化地计数一个基因的拷贝数,并且能够没有假阳性地检测单个SNV(虽然可能会有一定的假阴性)⁵。

最近,我们把MALBAC用于协助人工辅助生殖和癌症的研究,两者皆对精准医学有着重要意义。在人工辅助生殖领域,为了避免染色体异常和单基因疾病的遗传,MALBAC已经被应用于胚胎植入前基因组筛查(PGS)和胚胎植入前遗传学诊断(PGD)⁶。染色体异常(即染色体层面上的拷贝数变异)是流产及许多遗传性疾病(如唐氏综合征)的主要致病因素。同样,约7000种单基因遗传疾病会严重影响人类健康,并对病人家庭和社会医疗体系产生沉重负担。

虽然PCR、荧光原位杂交(FISH)和DNA微阵列芯片等方法都已经被用于PGD和PGS,MALBAC能够提供更高的精确度,并可以同时避免染色体异常和危险点突变的发生。2014年,随着两个“MALBAC婴儿”的出生,我们成功地利用了MALBAC来筛选健康胚胎,使婴儿基因组中避免带有父母中一方所携带的遗传疾病基因⁷。这为患有遗传性疾病(或携带遗传疾病基因)的夫妻带来了福音,他们现在可以以很高的成功率避免将那些具有严重危险的突变传给下一代。

在这两个病例中,MALBAC极低的假阳性和假阴性率完美地满足了父母希望后代不再携带严重的杂合致病突变的要求。类似的方法可以减少某些疾病(如乳腺癌)在下一代中的遗传风险。选择一个风险较低的等位基因(如特定的BRCA基因序列)在技术上是可行的,但在伦理层面上还需进一步讨论。

众所周知,癌症是一种基因组疾病⁸。循环肿瘤细胞(CTC)在进入外周血液循环后可能介导癌细胞的转移,并导致90%与癌症相关的死亡。MALBAC方法也被用于单个CTC细胞测序。与癌

症高度异质性的点突变不同,通过分析肺癌患者的单个CTC基因组,我们发现CTC的CNV模式在一个病人体内以及在患同一种癌症的不同病人中是相似的,但在不同的癌症类型中是截然不同的。此外,这些CTC中重复出现的CNV模式与患者的转移灶肿瘤细胞CNV模式也是一致的⁹。显然,染色体特定区域拷贝数的增减模式被肿瘤转移所选择。循环肿瘤细胞的CNV模式与癌症类型有关这一发现为我们提供了基于CNV模式进行无创癌症诊断的可能。因此,单细胞全基因组扩增方法的进一步发展将使我们不仅能够更好地了解肿瘤异质性和癌症转移的机制¹⁰,而且有望实现对癌症的个体化诊疗。

总结

DNA以单分子的形式存在于每个细胞中,因此基因表达和基因组的变化是随机发生的,这也使得在单细胞和单分子水平上的测量成为必需。单细胞基因组学发端于单分子技术与基因组学的交汇之处。在单细胞中进行精确基因拷贝数的计数以及基因点突变的检测现在不仅已成为可能,而且正在成为日益重要的技术。这些手段使得我们能够在单个分子的层面上检测、理解并改善生命过程,也为我们提供了“精准医学”的生动案例。

致谢:我很感谢我目前和过去研究组所有成员以及合作者的贡献,特别是乔杰、汤富酬、陆思嘉博士在人工辅助生殖项目上的贡献,王洁、白凡、张宁博士在循环肿瘤细胞项目上的贡献。

[JAMA 2015; 313(20):2021-2022]

(亦舟译)

目录摘要

Patiromer 对高钾血症和糖尿病肾病患者血清钾水平的影响 AMETHYST-DN 随机临床试验

Effect of Patiromer on Serum Potassium Level in Patients With Hyperkalemia and Diabetic Kidney Disease

The AMETHYST-DN Randomized Clinical Trial

乔治·L·巴克里斯(Bakris)等 美国芝加哥大学医学部医疗系美国高血压学会(ASH)综合高血压中心内分泌、糖尿病和代谢科等

意义 高钾血症是一种可能会危及生命的病况,主要见于因患3期或更严重的慢性肾脏病(CKD),而接受肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)抑制剂治疗的患者,患者还可能患有糖尿病和(或)心力衰竭。

目的 在高钾血症门诊患者中,为一项3期研究选择一种钾结合性聚合物 patiromer 的开始剂量,并对其长期安全性和疗效进行评估。

设计、场所和参与者 于2011年6月至2013年6月期间,在欧洲48家中心进行一项2期、多中心、开放标签、剂量范围的随机临床试验(AMETHYST-DN)。该试验在306例2型糖尿病门诊患者[$15 \text{ ml}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2) \leq$ 估计肾小球滤过率 $< 60 \text{ ml}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 和血清钾水平 $>$

5.0 mEq/L]中,对 patiromer 进行评估。在研究治疗开始之前以及期间,所有患者均接受 RAAS 抑制剂治疗。

干预措施 根据基线血清钾水平,对患者进行分层,分为轻度或中度高钾血症组,(各组分别)按照3种 patiromer 随机化开始剂量中的1种给予治疗[4.2 g (n=74)、8.4 g (n=74)或12.6 g (n=74),每日2次(轻度高钾血症);或者8.4 g (n=26)、12.6 g (n=28)或16.8 g (n=30),每日2次(中度高钾血症)]。对 patiromer 剂量进行滴定,以达到并维持血清钾水平为 5.0 mEq/L 或更低。

主要转归和检测指标 主要疗效终点为血清钾水平自基线至第4周,或至开始剂量滴定之前的平均变化。主要安全性终点为整个52周的不良事件。次要疗

效终点包括血清钾水平在整个52周的平均变化。

结果 总共306例患者接受随机分组。第4周或首次剂量滴定时,血清钾水平与基线相比的最小二乘法均值降幅,在轻度高钾血症患者中的数值如下:4.2 g、每日2次开始剂量组为0.35[95%可信区间(CI)为0.22~0.48] mEq/L,8.4 g、每日2次开始剂量组为0.51(95%CI为0.38~0.64) mEq/L,12.6 g、每日2次开始剂量组为0.55(95%CI为0.42~0.68) mEq/L。在中度高钾血症患者中,上述降幅如下:8.4 g、每日2次开始剂量组为0.87(95%CI为0.60~1.14) mEq/L,12.6 g、每日2次开始剂量组为0.97(95%CI为0.70~1.23) mEq/L,16.8 g、每日2次开始剂量组为0.92(95%CI为0.67~1.17) mEq/L(对于层内不同高钾血症开始剂量组,与基线

相比的所有变化,P值均 <0.001)。从第4周直至52周,在每月一次的每个时间点,观察到轻度和中度高钾血症患者血清钾水平平均降幅均具有统计学显著性。52周期间,低镁血症(7.2%)为最常见的治疗相关性不良事件,轻至中度便秘(6.3%)为最常见的胃肠道不良事件,低钾血症($<3.5 \text{ mEq/L}$)发生于5.6%的患者。

结论和相关性 在高钾血症和糖尿病肾病患者中,patiromer 开始剂量为4.2~16.8 g,每日2次,治疗4周后,可引起血清钾水平的统计学显著性降低,并持续整个52周。

[JAMA 2015;314(2):151-161. doi: 10.1001/jama.2015.7446]

(张福奎译)

启动他汀类治疗的10年危险阈值, 对于心血管病一级预防的成本效益

Cost-effectiveness of 10-Year Risk Thresholds for Initiation of Statin Therapy for Primary Prevention of Cardiovascular Disease

安库尔(Ankur)·潘迪亚(Pandya)等 美国波士顿市哈佛公共卫生学院卫生政策与管理系等

意义 对于无动脉粥样硬化性心血管病(ASCVD)病史成人的他汀类治疗,美国心脏病学会和美国心脏学会(ACC/AHA)胆固醇治疗指南具有广泛的影响。

目的 对ACC/AHA胆固醇治疗指南可能采用的不同10年ASCVD危险阈值的成本效益进行估计。

设计、场所和参与者 微观模拟模型,包括寿命时间范围、美国社会视角、3%的费用折扣率和健康转归。在模型中,假设的个体来自一个有代表性的美国人群,年龄为40~75岁,接受了他汀类治疗,经历过ASCVD事件,并且基于

ASCVD自然史和他汀类治疗参数,死于ASCVD相关性或非ASCVD相关性原因。用于模型参数的数据来源包括全国健康和营养检查调查、大型临床试验、对他汀类受益与治疗的荟萃分析,以及其他公开发表的资源。

主要转归和检测指标 估计得以预防的ASCVD事件和获得每个质量调整生命年(QALY)的增量费用。

结果 在基础病例情境中,当前的ASCVD阈值为7.5%或以上,据估计与48%应用他汀类治疗的成人有关,与10%或以上的阈值相比,其增量成本效益比

(ICER)为37000美元/QALY。采用更宽松的ASCVD阈值,4.0%或以上(61%的经治成人)和3.0%或以上(67%的经治成人),ICER分别为81000美元/QALY和14万美元/QALY。从7.5%或以上的ASCVD危险阈值,转变至3.0%或以上的ASCVD危险阈值,估计与额外避免161560例次心血管病事件相关。成本效益的结果对下列变化很敏感:与日服一片(药)相关的不便因素、他汀类价格,以及他汀类引发糖尿病的危险。在概率敏感性分析中,应用10万美元/QALY的成本效益阈值,最佳ASCVD阈值为5.0%或以下的可能性高于93%。

结论和相关性 在这个年龄为45~

70岁的美国成人微观模拟模型中,ACC/AHA胆固醇治疗指南目前采用的10年ASCVD危险阈值($\geq 7.5\%$ 危险阈值),具有可接受的成本效益谱(ICER为37000美元/QALY),但是,应用10万美元/QALY($\geq 4.0\%$ 危险阈值)或15万美元/QALY($\geq 3.0\%$ 危险阈值)的成本效益阈值,较宽松的ASCVD阈值会更理想。这个最佳ASCVD阈值对患者每日服用一片药的偏好、他汀类价格的变化,以及他汀类引发糖尿病的危险敏感。

[JAMA 2015;314(2):142-150. doi: 10.1001/jama.2015.6822]

(张福奎译)