

# 单细胞基因组学： 通往个体化医疗之门

■本报实习生 赵广立

随着第二代测序技术的普及,单细胞测序迎来了迅猛发展。

近日,南方科技大学生物系副教授贺建奎在美国冷泉港参加了单细胞分析会议后,在科学网博客里写道:“这是一个非常令人激动的前沿学术会议,我深深地体会到了单细胞基因组学时代的来临。”

他对《中国科学报》表示:“单细胞基因组测序技术的突破,只是开了一个很小的‘口’,‘口’的另外一边,就是一个非常漂亮的世界。”他说,单细胞基因组学研究的强劲势头,昭示着人类正逐步迈进个体化医疗时代。

更重要的是,测序技术的发展使基因测序民用成为大势所趋,个人DNA测序咨询服务即是一例。美国路易斯维尔大学研究员徐鑫认为,基于个人基因组DNA信息的健康评估有潜在市场,有可能发展成为一个新兴的庞大产业。



图片来源:昵图网

## 高通量测序的推力

“单细胞测序,就好像从太平洋里钓一条小鱼。这在以前是不可想象的,而现在我们技术上已经实现了单细胞测序,可以做很多以前不敢想象的事情。”贺建奎表示。

耶鲁大学一篇发表在《遗传》杂志上的文章指出,单细胞基因组学研究,致力于从最小量的样品(终极目标是单细胞)获得全基因组的最大信息,即在全基因组范围内鉴定在不同水平上影响生命活动的基因群的功能和相互作用。在只有或只能用单细胞或极少量细胞的情况下,单细胞测序技术将一展身手。

贺建奎介绍说:“高通量测序技术的发展,使单个基因组测序价格降到5000美元。”

单细胞测序在技术上实现突破,应归功于高通量测序技术。“新一代基因分析平台 Ion Torrent 巴掌大的芯片上就有上千万个测序孔”,据深圳华因康基因科技有限公司研发部负责人金虹介绍,类似于半导体集成芯片,高通量测序芯片的密度非常高,这样就能实现一次对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定,效率非常高。

微流控技术帮了单细胞测序一个大忙——减少甚至避免基因污染。贺建

奎说,微流控平台提供了一个适于单细胞基因扩增、与反应物充分接触、基因测序的“微试管”,可以降低单细胞测序的噪声。

他打了个很有意思的比方:“就好像我们把小鱼从太平洋赶到小池塘,只需要很少的鱼钩(反应物)就能把它抓到,而且大大减少了‘误捕’的机会。”

徐鑫认为,基因测序日益便捷,成本不断下降,研究人员都在努力向1000美元即可实现测序单个个人基因组的目标迈进,因此基因组DNA测序有可能逐步发展为民用。

目前我国在高通量测序技术上不甘落后。金虹表示,开展研发具有自主知识产权的高通量测序技术,对于我国在这一新兴领域的发展具有重要意义,尽管这个过程可能漫长而艰辛。

## 基因病变的曙光

测序技术目前已在癌症的诊疗中崭露头角。金虹指出,目前基因测序技术已经在癌症的诊疗中发挥作用,尤其是在靶向药物作用靶点的基因表达水平的检测,能给癌症患者实质性的帮助。

“然而,基因测序作为一种工具,目

前在民用方面的受惠面还很窄,远远没有发挥它的作用,现阶段主要的用途还是在科研方面。”金虹话锋一转,说:“不过我们有理由相信,基因测序将会越来越多地向临床应用方向发展。”

据了解,癌症基因组学的最新研究进展表明,癌症本身是一种多基因相互作用和影响的疾病,这正是癌症难以治愈的原因。而了解癌细胞如何在肿瘤内变化以及每个细胞内“定居”着多少版本的基因,这将有助于癌症诊断。

“肿瘤的演化过程是复杂的。”贺建奎认为,单细胞基因组学的研究,使人们能够认识癌细胞进化过程的更多细节,“比如我们有望通过研究从血液中分离出来的单个游离癌细胞,实现癌症的超早期诊断和治疗的实时监测。”他说,借此了解癌症的形成、扩散,可以为癌症的治疗提供更多的借鉴。

例如,近日深圳华大基因的研究人员揭示了癌症并非由常见的突变基因导致,在病人群体中所鉴定的频发突变可能与肿瘤个体无关。因此,在癌症分析和诊断过程中进行个性化治疗十分重要。

不仅对癌症,许多基因病变也可为鉴。贺建奎说,单细胞基因组学的一个

功能就是揭示基因病变的根本原因,解开基因治疗的密码,对不同患者对症下药。

2012年,美国科学院院士谢晓亮课题组与北京大学生物动态光学成像中心研究员李瑞强课题组等合作,首次实现了高覆盖度的单个精子的全基因组测序。谢晓亮表示,这项工作构建了迄今为止重组定位精度最高的个人遗传图谱,这一技术方法在男性不育症研究和肿瘤早期诊断及个体化治疗等生物医学领域有着广泛的应用前景。

## 重新审视生命

“尽管单细胞基因组学前景广阔,但并不意味着我们要改造生命。”贺建奎说,“帮助人们更深刻地观察、重新审视生命的奥秘,是单细胞基因组学研究的要义。”

一直以来,人体干细胞都被认为是单向地从不成熟细胞发展为专门的成熟细胞,生长过程不可逆转。

而2012年诺贝尔生理学或医学奖获得者,日本科学家山中伸弥和英国发育生物学家约翰·戈登关于细胞核重编程的研究,彻底改变了人们对细胞和器官生长的理解:他们发现,成熟的、专门的细胞可以重新编程,成为未成熟的细胞,并进而发育成人体的所有组织。

贺建奎认为,通过单细胞测序技术对每个细胞的测序,对比细胞间的差异,就有可能有新的发现,诸如“为什么有的干细胞发育成了心脏,有的发育成了手足?”此类命题,单细胞基因组学可能会给出不同的答案。

“我们通过对人体不同部位的单细胞的测序和基因比对,就有可能解开发育之谜。”贺建奎说,单细胞基因组测序将取代基因组测序的平均法则,“对于每一种疾病,也可以从单个细胞的水平重新认识,从而揭示病变的根本原因。”

《自然》杂志网站这样评价单细胞基因组学:测序技术的飞速发展和成本大大降低,使得基因组测序成为常规技术。然而,大多数的人类基因组、癌症等研究仍然通过多个细胞抽提DNA进行测序,其中所忽略的细胞间的差异对于控制基因表达、细胞行为和药物反应的问题却有可能是至关重要的。单细胞测序有望成为个体化医疗的重点领域。

## 本周看点

栏目主持:黄明明

邮箱:mmhuang@stimes.cn

新闻背景:近日,《科学》杂志刊登了美国伊利诺伊大学和东北大学研究人员发表的否定抗生素利用活性氧杀菌的两篇论文。然而,早在2007年,美国波士顿大学的Collins小组就在《细胞》杂志上发表论文称,抗生素可以诱导活性氧发挥杀菌作用。为什么得到肯定结论与提出否定意见的时差长达6年?为什么看似设计严谨、论证周密、权威把关的研究却得出相反的结论?

# 科学公案： 抗生素作用是非

■曾庆平

尽管上述两篇论文挑起了“抗生素诱导活性氧”之争,但相关研究者恐怕都没有意识到一氧化氮在抗生素抗菌中的关键作用,也没有考虑到抗氧化酶诱导与活性氧动态变化之间的复杂关系,这就是为什么他们对于同一个问题得出不同结论的症结所在。

在讨论抗生素的杀菌或抑菌机理之前,必须区分抗生素作用的特异性与非特异性。而且要强调抗生素以特异抗菌性为主,效率较高,以非特异抗菌性为辅,效率较低,因此不能把非特异抗菌性拔高到特异抗菌性的同等地位。

## 特异性与非特异性

抗生素的特异性作用是指不同抗生素特有的抗菌活性,而抗生素的非特异性作用是指不同抗生素共有的抗菌活性。抗生素的特异性抗菌作用已经得到肯定,而非特异性抗菌作用(如利用活性氧杀菌)仍然存在争议。

抗生素的特异性抗菌机制包括抑制细胞壁组装、蛋白质合成和DNA复制。 $\beta$ -内酰胺类抗生素(如青霉素)可抑制细菌细胞壁合成,导致细菌自溶;氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素)可使细菌蛋白质合成错误,产生的毒性多肽导致细菌自杀;喹诺酮类抗生素(如氧氟沙星)可将细菌DNA螺旋酶(拓扑异构酶)转变成内切核酸酶,使细菌DNA自毁。

## 借刀杀人,棋高一着

细菌细胞对抗生素通常没有耐受性,但细菌中的共生质粒因含有一个或多个抗生素抗性基因而赋予细菌对抗生素的耐药性。在抗生素丰富(如滥用抗生素)的环境中,携带抗性基因的细菌因选择性存活而表现出生存优势。

氨基青霉素(安比西林)抗性基因编码 $\beta$ -内酰胺酶催化青霉素及其衍生物抗生素的 $\beta$ -内酰胺环水解,可解除青霉素类药物对细菌细胞壁合成的抑制作用。氯霉素抗性基因编码氯霉素乙酰转移酶使氯霉素发生乙酰化修饰而不能与细菌核糖体结合,可阻断氯霉素对细菌肽酰转移酶的抑制。四环素抗性基因编码细菌膜结合蛋白可阻止四环素进入细菌细胞,从而避免四环素对细菌核糖体转位的抑制。

“超级细菌”NDM-1就是一种携带金属- $\beta$ -内酰胺酶基因编码质粒的甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA),它仅对万古霉素等少数抗生素敏感。假如NDM-1的耐药性基因不幸被结核分枝杆菌捕获,就会让治愈率越来越低的结核病防控变得“雪上加霜”。

## 把抗生素往外排

通过“药泵”将抗菌药物外排是细菌的主要耐药机制之一,尤其是多耐药药泵可将结构迥异的药物或有毒代谢物外排,成为多耐药细菌泛滥的重要原因。目前发现的细菌药泵主要包括ATP结合盒超家族(ABC)、耐药易化子超家族(MFS)、多重耐药(SMR)家族和多重及毒性化合物外排家族(MATE)。

单链阴性细菌含有以上5种药泵,而革兰氏阳性细菌仅有4种药泵(ABC、MFS、SMR和MATE)。药泵基因通常只在施加抗生素压力后才表达,但某些药泵基因在无抗生素条件下也表达。

## 逆境激发细菌“本能”

在极端不利的生长环境(如缺氧)中,细菌会合成一氧化氮。

同样,在有抗菌药物的条件下,细菌也会合成一氧化氮。由此推论,细菌产生一氧化氮的生态学意义可能就是为了对付逆境胁迫。这种“本能”在生物进化中是保守的,存在于细菌、真菌乃至高等动植物中。

一氧化氮具有以下4种功能,可以令抗菌药物大幅减毒甚至消毒,或提高细菌本身对抗菌药物的耐受性。直接解毒:一氧化氮可使抗菌药物吡啶黄(DNA嵌入剂)分子中的酰胺基发生重氮化并随即脱硝化而失活;抑制Fenton反应:一氧化氮可通过N-硝基化抑制巯基还原,从而阻断过氧化氢生成羟自由基;诱导超氧化物歧化酶:将超氧阴离子转变成过氧化氢;激活过氧化氢酶:将过氧化氢分解成水和氧。

一氧化氮的合成方式因不同细菌而异,革兰氏阳性细菌(如炭疽杆菌)含有一氧化氮合酶,可以利用L-精氨酸合成一氧化氮;革兰氏阴性细菌(如大肠杆菌)不含一氧化氮合酶,但能依赖亚硝酸还原酶、黄素血红蛋白等的催化活性以亚硝酸盐为前体合成一氧化氮。

## 活性氧:有还是没有

2009年《科学》杂志发表的一篇文章明确指出,细菌受抗菌药物诱导产生内源性一氧化氮可以保护细菌少受或不受抗菌药物的抑杀作用。遗憾的是,上述论文都没有引用这篇可能让其“矛盾”结果得到合理解释的关键论文。

抗菌药物诱导产生的一氧化氮可结合在细胞色素c氧化酶的血色素辅基上,通过抑制细胞色素c的氧化作用使呼吸链电子传递受阻,导致游离电子直接与末端氧反应生成超氧阴离子,并迅速诱导超氧化物歧化酶,使超氧阴离子转变成过氧化氢,再进一步诱导过氧化氢酶及过氧化氢酶,使有害的过氧化氢最终生成无害的氧和水。

由此可见,抗菌药物即使能诱导活性氧,也不是直接产生,而是通过一氧化氮间接产生。至于抗菌药物为何能诱导一氧化氮,有人推测可能是它们诱导一氧化氮合酶的直接诱导。已知辐射可诱导一氧化氮合酶基因表达及一氧化氮合成,暗示一氧化氮可能参与DNA修复和保护。

细菌中能否检测到活性氧与抗氧化酶的活性直接相关。如果抗生素作用时间及浓度超过细菌抗氧化酶的诱导能力及速度,那么应该可以检测到活性氧的存在。反之,若抗生素使用浓度过低,而且暴露时间过长,则会因抗氧化酶迅速淬灭活性氧而检测不到其存在。上述研究中使用的抗生素浓度太低,难以检测到活性氧就不足为奇了。

## 大有潜力的抗生素增效剂

在使用抗生素时,若配合使用一氧化氮合成酶抑制剂(如L-精氨酸的结构类似物),一氧化氮就无法合成,各种抗氧化酶的诱导也受阻,必然使活性氧水平升高,抗生素的抗菌效力相应增强。

青蒿素通过共价结合血红素ATP结合盒超家族(ABC)家族、主要易化子超家族(MFS)、多重耐药(SMR)家族和一氧化氮合酶,对细菌有害的过氧化氢酶增加。这说明在不降低抗菌效果的前提下,青蒿素与利福平联用大大减少了利福平的使用量。

鉴于目前抗生素研制的速度赶不上细菌耐药性滋生的速度,为了对付超级细菌尤其是超级结核杆菌引起的难治性感染,可以考虑应用抗生素与一氧化氮合成酶抑制剂组成的复方药物,以防止其广泛蔓延导致全球流行。(作者系广州中医药大学教授)

## ■热追踪·冷分析

# 谷歌投资选择背后的生物产业走向

■徐鑫

风险投资家常常有比一般人更为敏锐的投资眼光。关注投资家的选择,是窥探一个产业发展趋势的绝佳角度。

谷歌风险投资是谷歌旗下的一员,成立于2009年,总部分布在加州山景城、麻省剑桥和纽约,募集了1亿美元。这家公司投资的领域包括互联网、软件、硬件、洁净技术、生物技术以及医疗保健。

## 资金投向

在生物医疗领域,这家公司都把钱投给了谁呢?

诊断公司2家。23andMe成立于2006年4月,总部位于加州山景城,创立者是生物技术人员、生物学家Linda Avey、Anne Wojcicki以及Paul Cusenza。公司致力于基因检测。

Foundation Medicine成立于2010年,总部位于麻省剑桥,创立者是生物技术企业家Alexis Borisy。这家公司提供癌症的基因诊断服务。

基因治疗公司1家。Ipiernan成立于2007年,总部在加州南三藩,创立者是哈佛大学生化与分子药理学系副教授George Q. Daley和Lee L. Rubin。公司应用诱导多能干细胞治疗包括阿尔茨海默病在内的神经退行性疾病。

新抗体平台公司1家。Adimab成立于2007年,总部位于新罕布什尔州,创立者是两名酵母专家——达特茅斯大学教授Tillman Gerngross和麻省理工学院教授Dane Wittrup。公司致力于用酵母来制造抗体。

针对医疗市场的数据管理公司4家。DNAnexus成立于2009年,总部在加州山景城,创立者是斯坦福大学计算机科学副教授Serafim Batzoglou、病理和遗传学副教授Arend Sidow以及计算机科学家Andreas Sundquist。这家公司为基因组测序提供云计算支持。

Flatiron Health成立于2012年,总部位于纽约,创立者是两名非常年轻的工程

师Nat Turner和Zach Weinberg,他们曾经把一家技术公司卖给谷歌。Flatiron Health给肿瘤研究和临床提供数据平台。

Predilytics成立于2011年,总部设在波士顿,创立者叫Christopher Cololian。这是一家IT公司,提供针对医疗健康市场的评估等服务。

Wingu成立于2009年,总部位于麻省剑桥,创立者为Nick Encina和Brian Gilman,为医疗健康提供数据分析平台。

## 折射出的讯息

如何根据这些信息把握生物产业的前沿?

首先要明确投资公司的策略、优势和局限。对这些因素有大体了解之后,就可以根据投资公司的选择把握行业的趋势,而不至于被投资公司自身的局限影响。就像擦去镜子上的灰尘,才能反映出世界的本来面貌。

风险投资家如何保证客户的收益和自己的薪水?一方面是对有前景的公司大量投资,以期获得高收益。另一方面通过多元投资降低风险,说白了就是四处撒网,有赔有赚,东方不亮西方亮。

我们来看看谷歌风投的投资策略、优势和局限。DNAnexus、Flatiron Health、Predilytics和Wingu这4家公司都是从事和IT相关的医疗健康服务,而IT是谷歌的绝对强项,因此这是利用自己的优势来进军医疗健康市场的稳健举措。两家诊断公司都是以网络为平台的平台,对IT依赖很大。抗体和基因治疗确实是谷歌不熟悉的领域。总的来看,谷歌的投资符合稳健保守(投资自己熟悉的领域)和小有突破(Ipiernan和Adimab)的格局。

## 生物产业的趋势

首先,在医疗健康数据管理方面,个性化医疗导致对数据处理能力的极大需要。个人的医疗信息,在将来可能



图片来源:昵图网

涵盖基因组序列,将呈几何级数增长,因此,对医疗领域的数据处理必将成为新型的产业,这也是IT和生物结合的领域。

其次,在疾病诊断领域,基于早期诊断的预防医学必将大行其道,一方面是基因组水平的诊断来提高健康水平(23andMe),另一方面是对病人的遗传信息诊断提供更好的治疗(Foundations Medicine)。

第三,在干细胞治疗方面,虽然在2007年诱导胚胎干细胞就成为现实,而且2012年山中伸弥也因此获奖,但是医

疗应用还难以成为现实。尽管如此,越来越多的公司已涉足这一领域。

此外,还有新的抗体技术。利用抗体治疗是相对古老的技术,但还是有很大发展空间。致力于新的抗体平台的公司,不只Adimab一家。

透过投资家的选择来预测产业方向,需要注意投资家本身的局限,因为谷歌风投本身集中于与IT相关的领域,所以可能遗漏其他快速发展的生物产业。然而,不管怎样,对这个产业趋势的预测还是有一定代表性。

(作者系美国路易斯维尔大学研究员)