

生命奥秘

Lifeomics

2018年11月刊 总第110期

脂 肪 肝



- ▶ CRISPR-Cas技术必将引领遗传工程学的未来
- ▶ 摇滚打击乐手啄木鸟的秘诀：快速钙循环

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 : CONTENTS

专题 — 脂肪肝

前言	01
一、脂肪肝概述	02
二、脂肪肝的发生和发展	03
2.1 脂肪肝病情的发展具有个体差异	03
2.2 肠-肝轴：来自肠道微生物的威胁	08
2.3 儿童肥胖：日益受关注的问题	12
三、未来诊疗	15
3.1 药物研发，初见曙光	15
3.2 新型诊断方法	22

下一期（2018年12月刊）预告：肿瘤免疫疗法领域的重大变革

下一期《生命奥秘》将介绍肿瘤免疫疗法领域的重大变革。虽然一个多世纪以来，人们一直都在孜孜不断地研究肿瘤免疫疗法——调动免疫系统杀灭肿瘤细胞的方法，但是直到最近，这种强而有力的肿瘤治疗策略才正式成为主流肿瘤研究领域关注的焦点。过去几年，研究人员使用这种策略获得了前所未有的临床反应、快速取得药物研发进展，并通过了FDA的认证。

热点

CRISPR-Cas技术必将引领遗传工程学的未来	28
--------------------------------	----

百态

摇滚打击乐手啄木鸟的秘诀：快速钙循环	40
生物钟调节冬眠小鼠的节能模式	43

专题

脂肪肝

前言

全球肥胖和糖尿病的增加导致了非酒精性脂肪肝病（non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）的发病高峰。NAFLD往往会进一步发展成为更严重的非酒精性脂肪肝炎。本专题探讨了脂肪肝病的发生发展，新型药物和诊断方法的开发，以及由儿童肥胖引起的担忧。

特约编辑：张洁，女，博士在读，
研究方向：神经生物学



一、脂肪肝概述

健康的成人肝脏呈红褐色，重约1.5千克，是人的生物化学加工厂，能高效地完成多个生理任务。肝脏执行的一系列任务包括合成蛋白质、代谢药物、调节循环血量，并分泌消化所需的胆汁。此外，肝脏还负责调控血液中的糖、蛋白质和脂肪的含量。

不幸的是，过去几十年来，肥胖人数急剧上升，导致NAFLD的发病率陡增。NAFLD患者的肝细胞中充满脂滴。虽然运动和体重减轻能逆转症状，但对许多人来说，这只是另一种更严重的疾病——非酒精性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis, NASH）的开始。

NASH可能会进一步恶化为肝纤维化和肝硬化，最终可能导致严重疾病，甚至死亡。及早诊断NAFLD对于阻止疾病的发展至关重要。要做到这一点，就需要比肝活检更好、更无创的检测方法。超声波和磁共振成像工具正开始满足这种需求。

尽管目前研究人员已经发现NAFLD与居住在肠道的细菌之间有很大的联系，但令人担忧的是，已有越来越多的儿童患上NAFLD，这可能是由于遗传易感性和高脂肪饮食的双重影响。幸运的是，公众对NAFLD和NASH认识的加深逐渐推动了相关药物的研发进程。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



二、脂肪肝的发生和发展

2.1 脂肪肝病情的发展具有个体差异



并不是每位脂肪肝患者都会发展成肝癌。了解疾病发展的诱发因素有助于开发新的治疗方法。

NAFLD是发达国家最常见的慢性肝病，发病率达到25%。轻度肝脏脂肪变性的特征为：肝脏细胞中存在大量脂肪。在最严重的情况下，NAFLD可能发展成危险的、甚至危及生命的疾病，如肝功能衰竭或肝癌。

NAFLD的发展因人而异。肝脏细胞存在脂肪的患者中有30%会发展成NASH——肝脏中有炎症。大约20%的NASH患者会进一步发展成肝脏疤痕（肝纤维化）——当肝纤维化严重到影响肝脏功能时，就发展成了所谓的肝硬化，而肝硬化会增加患肝癌的风险。

关于NAFLD病程的大部分知识都来自配对活检研究，研究人员通过分析来自同一患者的、采集时间相距多年的组织样本来追踪个体的肝脏健康状况。过去30年至少开展了十几项此类研究。而且，越来越多的研究表明，将NAFLD的病程描述为“阶段性的有序发展”，显得太过简化了。例如，NAFLD患者可能直接发展为纤维化，而不经NASH炎症阶段，NASH患者即使没有纤维化也可发展为肝癌。

从某种角度来说，这种疾病进展的异质性

并不令人意外。其它几种非传染性慢性疾病，包括心血管疾病也具有类似的异质性特征。事实上，许多肝脏疾病，例如由乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒引起的疾病也同样如此。

然而，科学家迫切要知道为何某些人的NAFLD会恶化成其它更严重的疾病，而另一些人则不会。西澳大学（the University of Western Australia）的肝脏学家Leon Adams表示，他看诊时，会专注于预测哪些病人会发展成严重纤维化，甚至更严重的疾病。

Adams和其他临床医生都希望能够为每位患者提供更准确的预后信息。随着有效的NAFLD药物的临床应用，临床医生需要判断哪些是病情最可能发生恶化的患者，以确定谁应该服用这种药物。虽然只有一小部分脂肪变性患者会出现NAFLD的终末期并发症，但脂肪变性非常常见，因此这一小部分数量也不小。此外，脂肪变性的高发生率也使得确定谁不需要药物治疗同样重要，因为给所有患有NAFLD的人用药会给卫生保健系统带来负担，同时也会给那些不会发展成严重疾病的患者带来一定的成本和可能的副作用。



风险比例

NAFLD最常见于肥胖人群（BMI指数超过30的人群）以及代谢综合征患者。肥胖和代谢综合征都是心血管疾病和糖尿病的高风险因素。这些因素也影响NAFLD的进展。严重代谢综合征的患者也更容易发生肝纤维化。而且，当这些因素恶化时，例如BMI指数增加，或发生糖尿病或高血压等代谢综合征的并发症，肝纤维化也更容易恶化。

人们已知NAFLD的发展与年龄相关。这可能仅仅呈现出这种疾病趋于缓慢演变的事

实；老年人更可能长期接触危险因素。但巴黎第六大学（Université Pierre et Marie Curie）的肝病学家Vlad Ratziu指出，这种模式在未来几十年可能会改变。由于儿童肥胖症变得越来越普遍，发生严重NAFLD的年龄也可能提前。

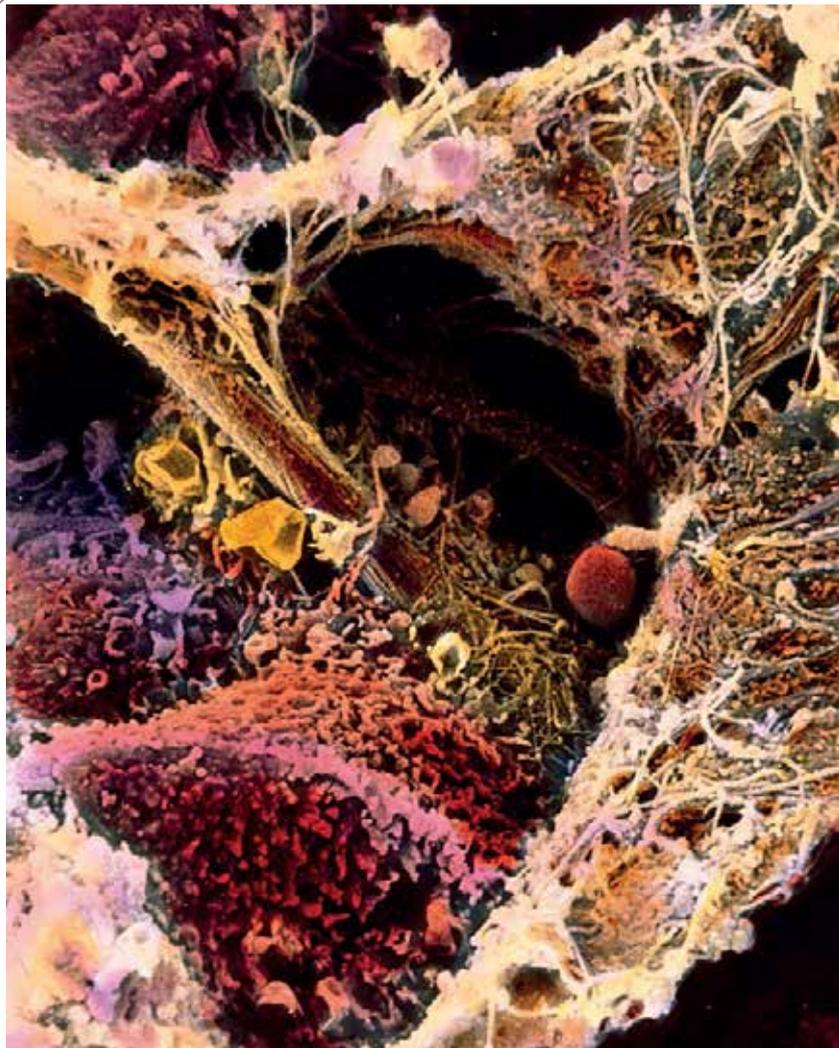
人体储存脂肪方式的变化也会影响NAFLD进展的风险因素。代谢综合症的一个主要特征是脂肪在腹部储存，因此那些倾向于在腹部长肉，比倾向于在臀、腿和胳膊上长肉

的人风险更大。同时，不同个体可能倾向于将脂肪储存于不同的部位，例如在肝细胞中储存或脂肪组织中储存。

此外，小鼠研究表明，脂肪在肝脏中储存和加工的方式会影响NAFLD的病程。当以甘油三酯液滴形式储存于肝细胞时，脂肪对健康的危害可能相对较小。但是其它类型的脂肪分子，以及脂肪分解并在细胞燃烧产生能量时产生的副产物可能会让肝脏产生毒性。这些分子的存在会引发炎症、氧化应激和肝细胞损

伤——这些都是NAFLD进展的特征。

进入肝脏的脂肪数量和类型取决于一个人的体重和新陈代谢状态，越来越多的证据表明肠道微生物群可能产生有害或引发肝脏炎症的分子。基因也是一个因素。瑞典哥德堡大学（University of Gothenburg）的分子遗传学家Stefano Romeo表示，遗传易感性在从肝脏单纯脂肪堆积到纤维化和NAFLD后遗症（炎症、纤维化和癌症）的发展中起着非常重要的作用。



人类肝脏组织纤维化（黄色部分）。

最强有力的证据显示，一种名为*PNPLA3*的基因可能与NAFLD有关。在美国，与引发NAFLD高风险相关的*PNPLA3*基因突变在西班牙裔人群中最为常见，因此西班牙裔也是NAFLD风险最高的人群；而该突变在非洲裔人群中最少见，同样非洲裔也是NAFLD风险最低的人群。*PNPLA3*负责编码影响肝细胞中脂质代谢的酶，肝细胞是肝脏中的主要细胞类型，负责肝脏的许多功能。该基因还影响肝星状细胞的活化，这会造成瘢痕组织，并因此导致纤维化。

虽然目前人们对*PNPLA3*酶的功能还没有了解得十分清楚，但已明确了这种酶对NAFLD流行病学的影响。英国纽卡斯尔大学（Newcastle University）肝病学家Quentin Anstee指出，*PNPLA3*已被多次证明是肝脏脂肪堆积、肝脏炎症、肝脏纤维化和癌症的影响因子。确切地说，它是脂肪肝病发病机制中每个主要步骤的独立调节因子。



注意体重！

在迄今为止最大的配对活检研究中，约40%的人显示出NAFLD恶化，约40%显示无变化，约20%显示病情改善或消退（S. McPherson *et al. J. Hepatol.* 62, 1148–1155; 2015）。体重减轻或代谢综合征出现改善（例如，可以更好地控制糖尿病或高血压）的人群，往往NAFLD也有所减轻。

一些通过生活方式或饮食干预来跟踪患者NAFLD进展的研究也得出了类似的结论。Adams表示，现在有令人信服的证据表明，如果通过饮食干预和运动来减轻体重，那么不仅可以改善NASH，还可以改善肝纤维化。

对于超重者来说，减轻体重可以带来积

另一个基因*TM6SF2*也被认为与脂质代谢有关，研究人员正试图弄清它对脂肪在肝脏中的储存方式和位置的影响。该基因的罕见形式与NAFLD高风险相关，然而却与心血管疾病的低风险相关。另一方面，常见形式的*TM6SF2*与肝脏疾病低风险相关，同时也与心血管疾病的高风险相关。

这种负相关性部分支持NAFLD是更广泛疾病的理论——实质上，NAFLD可能是代谢综合征对肝脏有所影响的体现。Anstee表示，*TM6SF2*几乎是发生代谢综合征的决定因素。

需要指出的是，遗传只占NAFLD风险因素的一部分。可改变的风险因素，如饮食和代谢状况都是主要因素。然而，对NAFLD遗传学的深入了解为药物开发提供了线索。正如Romeo所说，分子遗传学将帮助我们找出治疗这些患者的方法，使医生能够根据遗传变异将NAFLD患者进行分组。

极效果，包括降低胰岛素抵抗水平、改善糖尿病病情、减少炎性分子从脂肪组织的释放，以及减少进入肝脏的膳食脂肪量。Ratziu对此表示，减轻体重时，很多方面都会得到改善，绝不仅限于体重数字。

NAFLD的减轻证明了肝脏非凡的再生能力。毋庸置疑，年轻人和疾病不太严重的人最有可能得到改善。但除此之外，我们对于改善的机制，以及为什么一部分人有改善，另一部分人没有改善还知之甚少。

这是因为如果没有进行多次活检，是很难研究NAFLD的改善情况的——只有少部分患者会经历一次以上的活检。研究人员还不确定

那些参加配对活检研究的患者是否足以代表整个NAFLD群体。

因此，出于各种原因，为了帮助确定新确诊患者的预后，进一步了解NAFLD的性质，以及监测患者对治疗做出反应，尤其是对潜在药物治疗做出反应，研究人员正在寻找用于表征NAFLD进展的非侵入性生物标志物。

到目前为止，研究结果仍然令人沮丧。为了衡量由病毒性肝炎引起的肝纤维化而开发的血液测试似乎也提供了关于NAFLD纤维化的信息。但它只能检测相对严重阶段的NAFLD——无法在纤维化发生之前跟踪NAFLD的进展。炎症是NASH的标志，但无论身体哪个部位发生炎症，生化足迹都相似，因此将血液中的炎症标志物与肝脏发生的变化联系起来可能难度较大。

肝脏细胞发生损伤时，会产生丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferases, ALT），其在血液中的水平可以作为NAFLD进展和肝脏损伤的良好指标。但科学家发现，在没有

ALT升高的情况下，有时NAFLD也会进一步发展。因此，正常的ALT水平不能用于排除活动性NAFLD。

一种可能更有前途的方法来自表观遗传学——DNA的化学修饰改变基因的活性而不改变DNA序列。Anstee的小组正在研究由主要在肝细胞中表达的基因的DNA上的甲基基团组成的、并在血液中自由循环的表观遗传标记。其他研究人员正在研究影响基因表达的非编码RNA是否可以作为NAFLD的生物标志物。

创新的成像方法可以显示NAFLD的进展，而不再需要活检。用于测量病毒性肝炎患者纤维化的方法也可用于NAFLD。某些磁共振成像技术或许可以用于量化肝脏脂肪，为病情早期阶段提供一个窗口。但Anstee指出，目前的技术还难以区分脂肪变性与NASH，或者更精细地鉴别肝脏纤维化的程度。目前，NAFLD复杂且多变的病程仍然是肝病科学家面临的重要问题。

2.2 肠-肝轴：来自肠道微生物的威胁



研究人员使用无菌小鼠来研究肠道细菌在NAFLD中的作用。

改变肠道菌群或许有助于预防和治疗NAFLD。

全球超市提供各种各样的饮料、酸奶和膳食补充剂，销售声称这些饮料能够帮助补充肠道益生菌，清除有害细菌。据加拿大不列颠哥伦比亚大学（University of British Columbia）营养学家Azita Hekmatdoost介绍，这些益生菌可潜在地用于预防或治疗NAFLD——一种

涉及肝细胞中脂肪堆积（脂肪变性），并可能发展成更严重的NASH的疾病。2017年，Hekmatdoost等人发表了一篇关于肠道细菌在NAFLD中，及其在NAFLD发展成NASH过程中的作用的综述。在该综述中，Hekmatdoost列举了诸多证据来支持益生菌有助于预防和治

疗NAFLD的理论。

Hekmatdoost表示，似乎NAFLD发病机制中至少有一个因素是肠道病原菌超载。因此减少肠道病原菌的负荷将有助于改善肝脏的健康状况。

Hekmatdoost还表示，产生这种效应最可能的机制涉及脂多糖（也称为内毒素）。脂多糖是细菌细胞壁的一种成分，由碳水化合物和脂肪组成。脂多糖进入循环系统后，会随血液

从肠道输送到肝脏。在肝脏里，它们与免疫系统细胞表面的受体结合，诱导炎症和胰岛素抵抗。

Hekmatdoost等人进行了临床试验，旨在评估益生菌补充剂在改善NAFLD患者脂多糖有害效应上的潜力。她指出，无论是肥胖患者，还是正常患者，益生菌都能够“改善胰岛素抵抗、肝脏脂肪变性和纤维化”。



一个隐藏的世界

人类肠道居住着数以万亿计的细菌，其中的基因数量加起来是人类基因组基因数量的100倍以上。鉴于这种巨大的规模，微生物的活动可以对人体的健康产生相当大的影响。微生物基因通常编码蛋白质，如酶，这些蛋白对人体生理机能起积极作用。这些微生物产生的蛋白质以及小分子在食物消化上扮演重要角色。

许多证据表明，肠道细菌可以影响NAFLD的发展。例如，细菌群体组成的变化（称为菌群失调）与肝脏中的几种破坏性作用有关。

通过比较NAFLD患者的肠道菌群与健康人群的肠道菌群，科学家发现了一些可能影响NAFLD的差异。例如，在NAFLD患者中常见的某些肠道细菌在从食物中获得能量的代谢活动上更活跃。因此这些细菌可能导致肥胖，而且已被确定为NAFLD的主要危险因素。

更微妙的联系与内毒素有关。营养不良不仅会增加肠道细菌内毒素的分泌，还会使肠壁对这些分子更具渗透性。结果，更多的内毒素进入循环系统，到达通向肝脏的门静脉。

营养不良还会降低多蛋白复合物（可调节对感染和损伤的炎症反应）的水平。肠道菌群紊乱增强了有害的炎症，并使更多的内毒素到达肝脏。

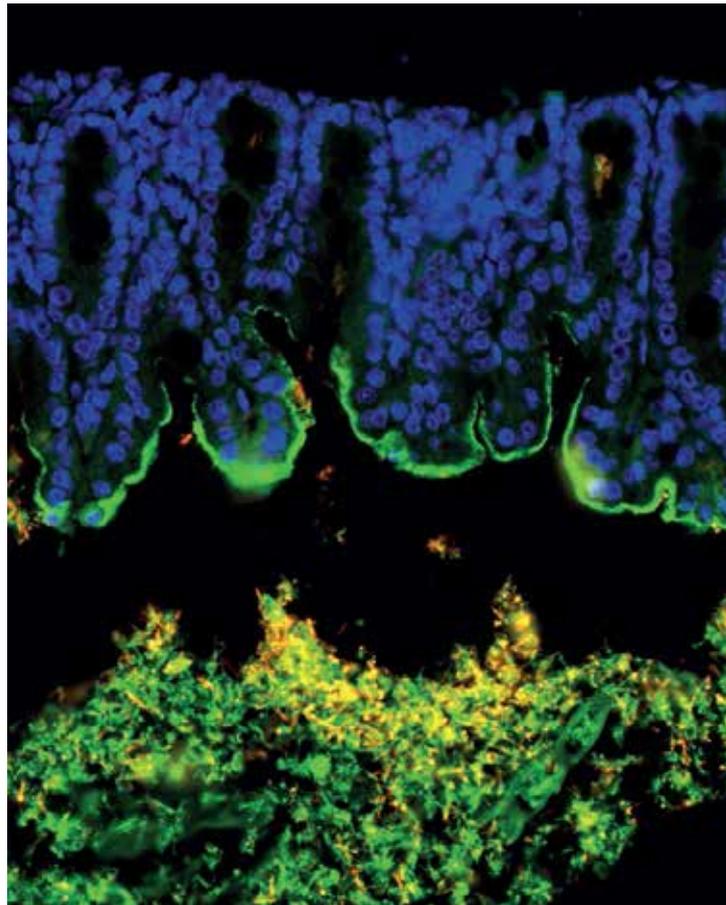
菌群失调的另一个后果则是导致生产乙醇的细菌种群规模增加。因此，尽管NAFLD这个名称中含有“非酒精”这一字眼，但现实情况更为复杂——来自细菌的“酒精”或许依旧对NAFLD的产生和发展起作用。

目前还不清楚肠道菌群失调在肝损伤中的具体作用机制和相对重要性。然而，肠道菌群变化与NAFLD之间的联系越来越为人所接受。

原因和改善方法

有一个动物实验方法提供了强有力的证据，该实验显示菌群失调是NAFLD的原因，而不是结果。2013年，由法国茹伊昂若萨Micalis研究所（Micalis Institute）的微生物学家Philippe Gérard领导的团队将NAFLD小鼠的粪便（包含肠道菌群）移植到没有NAFLD的小鼠体内。之后，体重正常的受体小鼠出现了NAFLD的症状。

这些结果使研究人员得出了两个主要结论：首先，肠道细菌确实会加剧NAFLD病情；其次，即使在不肥胖的小鼠间也可能会发生这种传播。Gérard还参加了一项实验，重点研究与酒精相关的肝脏疾病，研究人员将酒精性脂肪肝患者的肠道细菌移植到健康的小鼠体内。随后这些小鼠都患上了NAFLD，表明肠道菌群与肝脏疾病之间存在更普遍的联系。



小鼠肠道中的细菌（绿色、黄色和红色）。

为了有助于开发潜在的治疗方法，Gérard正在努力学习更多关于人体肠道菌群的知识，尝试“识别有益和有害细菌”。

目前人们还不确定与NAFLD相关的肠道微生物变化的细节。尽管许多研究记录了NAFLD患者肠道菌群与健康人的差异，但结果并不一致。即便如此，我们还是可以找到一些共有模式的。例如，NAFLD肥胖人群的厚壁菌门（Firmicutes）的特定细菌数量会增加。然而，NAFLD进展到NASH人群，某些厚壁菌的丰度则会降低，*Parabacteroides*和Firmicutes *Allisonella*菌的丰度较高。目前人们仍在探索这些变化的重要性。另一个令人感兴趣的问题是，一些患有NAFLD或NASH的儿童和青少年表现出不同于成年人的微生物变化模式。

NAFLD领域需要进一步确定肠道微生物群与NAFLD之间的关联。Hekmatdoost等人正计划研究这个课题。她们正在开展一个项目，以对比分析肥胖NAFLD患者、非肥胖NAFLD患者、肥胖健康人群和健康人群之间的微生物群落。

鉴于诸多证据均表明肠道微生物群变化与NAFLD之间存在因果关系，许多研究人员都在思考为什么会发生这些变化，以及是否可以逆转这些变化。

Hekmatdoost指出，肠道菌群变化的原因不能单纯地归结为饮食不当，但饮食是最重要的改变因素。

即使人们了解了需要做出的饮食改变以及背后的原因，也很难让他们将其付诸行动。但是，Hekmatdoost认为存在更直接的干预选择。她指出，益生菌补充剂会是个不错的方法，并且她还指出了益生元补充剂——促进有益细菌生长的饮食成分，如益生菌——的作用。Hekmatdoost强调，可溶性膳食纤维是一种有效的益生物质，他建议NAFLD患者增加富含这种纤维的食物（包括豆类、水果和全谷物）的摄取量。

但支持这些干预措施对人类NAFLD和NASH有益的证据是不完整的。目前一些研究，包括Hekmatdoost的研究，已经完成，而更多研究还正在进行或计划中。但是正如Hekmatdoost等人在2017年的综述中所指出的那样，这样的研究还是远远不够的。他们强调，尽管益生菌补充在NAFLD上的潜力十分明显，但仍需进行更彻底的调查，这方面的研究仍然相对滞后。

2013年，香港中文大学（the Chinese University of Hong Kong）的Vincent Wong等人完成了一项概念验证研究，即使用益生菌治疗NASH患者。他们发现，患者出现了明显好转，并在此基础上开展了进一步和更大型的研究，继续调查研究结果。该团队已经发现，从肠道进入肝脏的内毒素水平与NAFLD的严重程度有关。Wong现在正在进行一项随机对照试验来测试肥胖人群粪移植的有效性——他希望确定直接改变肠道微生物群的组成对治疗肥胖和NAFLD是否有效。

在2017年1月的工作报告中，沙特阿拉伯伊玛目阿卜杜勒拉赫曼大学（Imam Abdulrahman Bin Faisal University）的Kamal Adel Amin和Hessah Mohammed Almuzafar调查了添加益生菌对大鼠NAFLD的影响。结果显示，益生菌补充可防止高脂肪、高蔗糖饮食的大鼠发生NAFLD，而对照组在相同饮食下则会发生NAFLD。这一发现表明，益生菌补充剂或许可以为不容易改变饮食习惯的人群带来希望。

研究人类微生物组（人体内细菌的整个基因组）的几个大型项目可能有助于加速该领域的研究。2017年4月，加州山景城的研究机构Verily（谷歌旗下生命科学公司）宣布在美国开展一项包括1万名参与者的微生物组分析研究。8月，IBM启动了微生物免疫项目，将其描述为“迄今为止从肠道开始的、人类微生物群的最大研究”。鉴于人们对肠道细菌的兴趣在不断增加，NAFLD领域可能会因此受益。

2.3 儿童肥胖：日益受关注的问题



过去脂肪肝通常发生在成年人身上，但随着儿童肥胖率的增加，儿童脂肪性肝病的发生率也日益增加。

不断增长的儿童肥胖率意味着更多儿童会罹患NAFLD。

当一个通常与长期酗酒相关的疾病——肝脏严重瘢痕的形成或肝硬化——开始出现于8岁以下的儿童时，情况就不容乐观了。

纽约哥伦比亚大学医学中心（Columbia University Medical Center）小儿胃肠病专家 Jennifer Woo Baidal 表示，他有一个十几岁的小病人，这位病人甚至没有接受过肝脏疾病的评估，在为了减肥而做手术时，被发现肝硬化。

一般来说，肝硬化的病因都是重度酗酒或感染了肝炎病毒，但肥胖大流行的发生改变了这一情况。

现在全世界的儿科医生正在看到越来越多的儿童和青少年——其中大多数超重或肥胖——发生NAFLD，以及更严重的后遗症——NASH。更令人震惊的是，一些年轻人出现肝纤维化，另一些年轻人则出现不可逆转的肝硬化。

Woo Baidal 指出，公众，甚至儿科医生都花了很长一段时间才意识到儿童时期的肥胖与肝脏并发症有关。随着NAFLD打败病毒性肝炎、胆道梗阻等先天性疾病，以及遗传性疾病（如威尔逊氏病），成为美国儿童肝病的最常见原因，公众才意识到儿童时期的肥胖是元凶。

全球约有7.6%的儿童和青少年患有某种形式的脂肪肝疾病。在美国，青少年疑似NAFLD患病率从1988年至1994年间的3.9%上升至2007年至2010年间的10.7%。

哥伦比亚大学医学中心（Columbia University Medical Center）的儿科医生 Joel Lavine 指出，大约三分之一的NAFLD儿童其病程与成年人完全不同。NAFLD儿童的肝脏往往在门脉周围（而非肝叶）聚集了大量的脂

肪和炎症，并且表现出更少的细胞损伤迹象。罹患这种特殊NAFLD的儿童往往年纪更小，还未到青春期。这种特殊NAFLD在西班牙裔中发生率更高，且在男孩中更常见。

与罹患普通NAFLD的儿童相比，罹患特殊NAFLD的儿童往往发生更多的纤维化和肝硬化，这些症状预示着存在更严重的疾病。

对此，Lavine 表示，这并不是一个小问题，而且也不会消失。与成人患者及成人疾病相比，这种儿童时期的疾病十分令人担忧。

英国剑桥大学（University of Cambridge）儿科医生 Jake Mann 指出，NAFLD和NASH在儿童中日益流行会给儿童健康造成长期且严重的后果。尽管在成年人中，NAFLD的病程可以描述成：从肝脏中的脂肪沉积（脂肪变性）到炎症、疤痕形成，然后肝脏衰竭，最后需要肝移植，但儿童和青少年的NAFLD病程却并非如此，而且学界对此知之甚少。

他还指出，有一些儿童的肝脏会像成人一样出现明显的纤维化，但大多数患有脂肪肝的儿童可能只是单纯的脂肪变性，这被认为是一种更为可逆的疾病。

Mann 表示，据他所知，迄今为止还没有一个儿童或青少年NAFLD患者恶化到需要进行肝移植的阶段。他指出，即使在最糟糕的情况下，恶化成肝衰竭也需要20年。治疗儿童或青少年NAFLD，就是在减轻成人肝病专家 的负担。

所以重中之重是识别患有NAFLD的儿童，并在病情发展之前就进行干预。然而NAFLD通常无症状，除非发展成更严重的形式，这使得识别NAFLD儿童难度很大。

种族似乎在其中扮演着非常重要的角色：

有西班牙裔、南亚裔或美国原住民背景的儿童罹患NAFLD的风险特别高。某些基因，包括影响肝功能和肝脏中脂肪堆积等与NAFLD风险的增加有关。罗马Bambino Gesù儿科医院（Bambino Gesù Paediatric Hospital）的小儿胃肠病专家Valerio Nobili建议，应该在病情无法挽回之前，对所有超重或肥胖儿童进行NAFLD筛查以确定病情。

Nobili指出，与NAFLD作斗争的战略是说服所有参与者了解这种疾病的危险性，以及在疾病变得不可逆转之前尽快采取行动的必要手段。儿童早期NAFLD的治疗方法与成年

NAFLD的治疗方法非常相似：体重减轻和生活方式改变。Woo Baidal表示，让一个正在成长的孩子保持体重可能比试图让一个成年人减肥更容易。目前很少有儿童参与NAFLD药物治疗的介入性试验。

Nobili指出，维生素E、 Ω -3脂肪酸和糖尿病药物二甲双胍在临床试验中的效果极小，迄今为止结果也是“令人不满意”。由于公众重新关注儿童NAFLD，所以他非常乐观。Nobili认为，现在社会对小儿NAFLD问题的关注度非常高，他对未来几年的进展仍然充满信心。



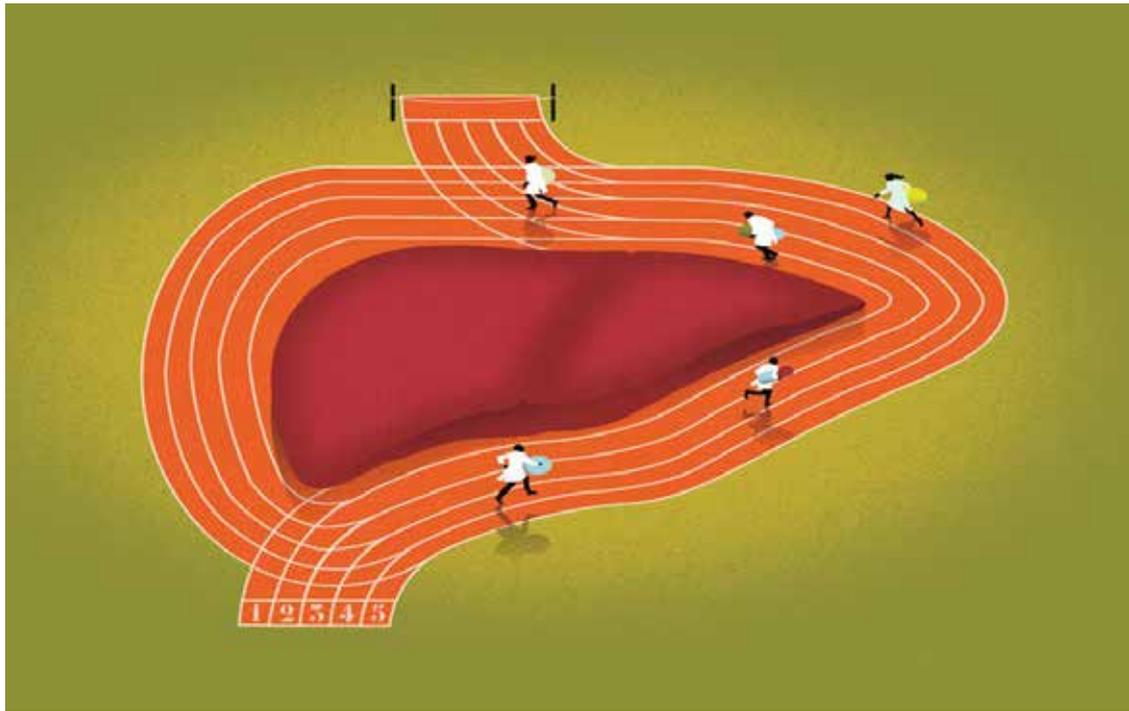
百态·频道

www.LifeOmics.com



三、未来诊疗

3.1 药物研发，初见曙光



生物科技初创公司和制药巨头都在踊跃开发针对NASH的药物。

2014年1月，Intercept Pharmaceuticals 公司宣布，提前一年停止NAFLD潜在治疗的2期临床试验。接受评估的治疗方案是72周服用奥贝胆酸（obeticholic acid），疗效非常明显。试验参与者患有严重类型的NAFLD，即NASH。奥贝胆酸减少了患者的肝脏炎症和瘢痕。在宣布提前终止试验的当天，Intercept的股价几乎翻了两番；周末结束时，Intercept的股价又翻了一番。

2015年，全球医疗保健公司Merck与加州旧金山的NGM生物制药公司签署了一份价值4.5亿美元的协议，用于购买NGM公司最有潜力的NAFLD治疗药物。制药巨头Gilead Sciences公司不甘人后，向德国路德维希港的Phenex制药公司支付4.7亿美元，用于购买后者的NAFLD药物开发项目。2016年，这种交易还在继续：4月，Gilead Sciences通过收购Nimbus Therapeutics的子公司，购买了另一个有前景的NAFLD化合物，这笔交易初始投资额为4亿美元，其后总额可能增至12亿美元；几个月后，位于都柏林的制药公司Allergan以16.9亿美元收购了南旧金山的Tobira Therapeutics公司及其NAFLD候选药物。与之前几年狂热的步伐相比，2017年一直相对平静——但即便如此，瑞士制药巨头Novartis公司已经向加州圣地亚哥的Conatus制药公司支付了5000万美元的初始投资，用于开发

Conatus的NAFLD药物，其支付总金额可能达到6.5亿美元。

虽然这些公司都投入了巨额资金，但带来的回报可能更大：金融分析师预测，到2025年，NAFLD药物市场每年将价值200亿至350亿美元。然而到目前为止，还没有药物被特别批准用于治疗这种疾病。

目前已有超过200项NAFLD治疗的临床试验，并定期发布正在开发的药物的讨论文章。2013年，这些文章只会讨论几个潜在的治疗方法；现在他们讨论的候选药物已超过30种。尽管其中一些药物在分子水平上针对相同的过程，但最引人注目的不是化合物的数量，而是它们作用方式的多样性。

当被问及目前NAFLD领域是否异常繁忙时，纽约西乃山医院（Mount Sinai Hospital）的肝病专家Scott Friedman表示，这还只是冰山一角。Friedman目前担任40多家公司的顾问。除了潜在的巨额回报之外，他和该领域的其他专家将药企对NAFLD治疗的兴趣归因于以下因素：

- 1) 临床理解的转变；
- 2) 药物管理机构对NAFLD趋势做出了积极响应；
- 3) 具有前瞻性的生物技术公司；
- 4) 具有为迎接挑战做好准备的制药部门。



肝脏专家Scott Friedman正在研究NAFLD。

NAFLD领域的发展

现在NAFLD被认为是一种严重的疾病。但是，与过量饮酒导致的肝脏脂肪堆积不同，直到1980年，NAFLD才被确认为一种新疾病。在那之前，如果一个脂肪肝患者告诉医生，自己没有酗酒习惯，医生会认为他在说谎。对此，英国纽卡斯尔大学（Newcastle University）的肝病学家Christopher Day指出，即便医生相信，大家也存在一种普遍误解，即“如果肝脏中的脂肪不是由酒精导致

的，那么就相对良性”。在20世纪90年代由Day等人进行的一系列研究证实，与过量饮酒无关的脂肪堆积可能会导致非常严重的疾病。

目前，NAFLD被视为一种渐进性疾病，可分为几个阶段。脂肪肝——肝脏中5%或更多的细胞含有大量脂肪沉积物，但没有炎症，或有少量炎症——是最温和的类别，通常被认为是良性的。然而，如果积累的脂肪导致炎症，细胞“膨胀”然后死亡，那么患者就会发

展成NASH。

NASH患者的心血管疾病风险增加一倍，发生肝硬化或肝癌的几率会增加十倍。但是NASH也可以细分为多个阶段，并且从NASH进一步发展出并发症的风险因人而异。特别是发生炎症并伴有一定程度纤维化的患者最容易发生并发症，并且最有可能预后不良。肝脏专家认为这些患者都是即将上市的NAFLD新药的最大受益者。

医学界和制药界之所以严肃对待NAFLD，另外一个原因是，自1980年以来，其患病率一直呈上升趋势。尽管年龄、种族、性别和遗传因素都有影响，但主要的风险因素却是肥胖和糖尿病，以及其它类型的代谢综合征，如高血压、高血脂和胰岛素抵抗。里士满弗吉尼亚联邦大学（Virginia Commonwealth University）的肠胃病学家Arun Sanyal指出，这些因素结合起来，开始将代谢底物——碳水化合物和脂肪——以代谢机制无法处理的速度送入肝脏。

Friedman表示，在过去的几十年里，世界范围内肥胖速率迅速增加，导致NAFLD发病率急剧上升。自2004年以来，美国由于NASH而需要肝移植的人数飙升，预计未来5到15年内NASH将成为器官移植的主要原因。

事实上，据估计全世界有四分之一的人有某种形式的NAFLD。在美国，高达1亿人可能会患上脂肪肝，其中2000万至3000万人可能已经患上了脂肪肝。对于大多数人来说，医疗建议是运动和减肥，因为轻度至中度的NAFLD可以通过改变生活方式来逆转。然而，美国有100万至300万人可能患上严重到需要进行药物治疗的NASH——这一数字促使制药部门采取行动，以把握这一巨大、日益增长，且未满足的医疗需求机遇。

发病率的上升和药企的积极行动让监管部门开始关注NAFLD。FDA和欧洲药品管理局

（European Medicines Agency）趁着药企兴趣不减，立刻为NASH治疗药物的快速上市创造了可行的途径，这一点受到了医生的表扬。

监管部门采取的一个关键措施是规定NAFLD药物的临床试验只需要证明新的治疗方法可以减轻肝脏炎症和纤维化的严重程度（可用肝活检结果表征），而不必直接证明降低了参与者发展成肝硬化、肝衰竭或其它结果的几率。由于肝脏炎症和纤维化在6-24个月内都可以衡量出来，而观察积累的肝损伤则需要几十年，因此这些措施可以大大缩短药物上市的时间。由于目前缺乏NASH治疗药物，所以候选药物不需要和特定药物比较——只需要比安慰剂有效就可以通过试验了。

NAFLD药物开发热潮背后的其它因素更为微妙，但也很重要。Day和Friedman认为，20世纪90年代丙型肝炎疫情把药企的目光吸引到了肝脏上，因为药企在肝病上投入了大量资源，从而了解到了NAFLD。鉴于丙型肝炎得到有效治愈——抗病毒治疗至少可以治愈95%的病例——肝病似乎易于处理，对于制药公司来说，将资源转移到另一种日益普遍的慢性肝病似乎是一种明智和直接的选择。

然而，不仅仅丙型肝炎的研究与NAFLD相关。由于NAFLD是一个多方面的和渐进的病症，NAFLD的研究跨越多个领域，包括与肥胖和胰岛素抵抗相关的代谢问题，以及慢性炎症和纤维化。由于相关机制较多，所以NAFLD药物可靶向的途径也很多。然而由于几十年来，每个领域的研究一直彼此独立，所以很多正在试验的NASH药物其实原本是针对其它疾病开发的。Sanyal指出，过去20年来一直在研究炎症的、研究新陈代谢的、研究减少肺纤维化和其它纤维化疾病的专家都在测试自己开发的药物对NASH有没有效果。

但这不仅仅是大型制药公司将其资源从一种肝脏疾病转移到另一种肝脏疾病的问题。

巴黎第六大学（Université Pierre et Marie Curie）的肝病学家Vlad Ratziu认为，NAFLD领域的发展在很大程度上要感谢“Genfit和Intercept这两个生物技术公司的强大意志和奉献精神——一只研究NAFLD药物”。这两家公司

司早在FDA更新监管通路之前就为NASH制定了计划，并在开展大型临床试验方面处于领先地位。Ratziu指出，这些试验的结果，特别是由Intercept进行的试验结果“突然改变了现状，并显示患者病情可以得到改善”。

NASH治疗

为了了解在数百次试验中受试药物的表现，Sanyal将潜在的NASH疗法分为四类，每一类由具有共同目标但作用机制不同的药物组成。其中一类是那些靶向由过量脂肪造成的代谢压力的药物。另一类则包括能抑制炎症，并阻止细胞死亡的药物。此外，还有抗纤维化药物。最后，还有一些药物在肠道中阻止脂肪吸收或减少炎症——一些可能是由肠道微生物群引发的症状。有时各个类别的区分并不是那么明显——例如，某些药物既能用于抗炎，又能用于抗纤维化。

由Intercept公司和Genfit公司开发的化合物能靶向代谢压力。这两种药物都可以激活细胞核中调控基因表达的受体。Intercept公司的奥贝胆酸可以激活FXR的受体，而Genfit公司的药物elafibranor则可以激活两种与PPAR相关的受体。

Ratziu指出，因为这些受体可以改变许多基因的表达，所以这些药物至少可以在动物模型的细胞损伤通路中发挥作用。例如，能激活FXR的药物可以减少胰岛素抵抗和脂质合成水平，并且还具有抗炎和抗纤维化的作用。

旨在减少代谢压力的其它药物则可以通过模仿内源激素来发挥功能。Merck于2015年从NGM购买的药物（一种参与人类FXR信号转导的激素FGF19的工程化版本）具有多种作

用。研究人员对GLP-1激素类似物也有很大的兴趣——这类药物被用于治疗2型糖尿病，目前正在进行NASH试验。

另一种获准用于治疗糖尿病的药物evogliptin是Allergan公司与Tobira公司的NAFLD药物开发合作的一部分。通过抑制酶DPP-4，evogliptin能发挥几种作用，包括增加胰岛素分泌，这可以缓解NASH病情。与此同时，Gilead公司收购了Nimbus公司的合成脂肪酸的酶的抑制剂，希望将它用于治疗NASH。理论依据是：如果可以预防有毒脂肪的积聚，那么可能也可以预防NASH。

在抗炎方面，Allergan公司对其从Tobira公司处购买的另一种药物寄予了很高的期望。该药物是趋化因子受体拮抗剂，这种受体有助于介导持续性炎症。Novartis公司今年从Conatus公司处购买的药物通过抑制caspase酶来抑制炎症。Gilead公司表示，他们正在推出的一种药物可以阻断ASK1（参与程序性细胞死亡的酶），而且通过抑制这一过程，该药物在短短6个月内降低了NASH患者的肝纤维化程度。

目前，旨在阻止肝脏瘢痕形成途径的其它疗法、许多靶向肠道的药物，包括益生菌补充剂的试验正在如火如荼地开展中。

成王败寇

治疗NASH的多种方法反映了NASH的复杂性及其基本病因的不确定性。Freedman指出，NASH是一种有许多异常关联的疾病。对于这种疾病，分级是很重要的，但目前还没有制定分级标准。NASH是起源于脂肪，还是起源于肠道菌群失调？抑或起源于胰岛素抵抗或氧化应激？

由于上述问题还没有答案，药物开发者将NASH的每个异常症状都视为潜在的治疗目标。但Freedman强调，每个过程对整体疾病表型的影响程度，目前还没有定论。我们可以直接选择其中一个靶点，也许真的能获得成功，但实际上，很可能这个靶点对治疗疾病的影响只有5-10%。

只有通过临床试验，才能明白各个过程对疾病治疗的作用。Day指出，尽管有许多药物“在小鼠模型中看起来表现非常突出”，并且在人类中获得了初步成功，但是实际上，一路过关斩将，通过随机对照研究的（两年随访，并在随访开始和结束时进行活检）药物少之又少。

鉴于此，在涉及数百人的类似试验中，奥贝胆酸和elafibranor的成功引起人们的极大关注。然而，即使在这两个研究中，肝脏病情得到改善的参与者的比例也只有20-45%，而接受安慰剂的参与者的这一比例为10-20%。

虽然奥贝胆酸和elafibranor能够作用于正确的靶点，但效力一般。许多公司正在开发第二代FXR激活剂和其它PPAR激活剂，希望能提高对这类药物的响应率。另外，奥贝胆酸的副作用引起了人们的担忧：一些服用者的低密度脂蛋白（low-density lipoproteins，也称为“坏”胆固醇（‘bad’ cholesterol））水平升高，并且近四分之一的患者发生了持续性瘙痒。更严重的是，2017年9月，FDA发布了一项安全警告，在因其它严重肝脏疾病而服用奥

贝胆酸的患者中，有19人死亡。这一警告导致Intercept公司股价大跌——回到2014年暴涨之前的水平。

或者，这些不可思议的结果共同反映了NASH病因的复杂性；或者如Freedman所说，NASH是多个过程共同作用的结果。如果是前者，那么不同的人可能受益于不同的药物；如果是后者，那么NASH的全面解决方案可能需要联用针对病症不同方面的药物。

Sanyal表示，目前临床上采用代谢压力、炎症和疾病阶段（可用纤维化程度表征）来表征疾病活跃性，事实上我们应该独立评估各项指标，从而找出最适合患者的药物。他认为，单独一种药是不可能改善所有指标的。如果疾病活跃性较高，那么可以优先选择代谢应激抑制剂或抗炎药物；如果瘢痕程度高，那么则可以优先使用抗纤维化药物。

Freedman表示，目前该领域正在迅速调研联合疗法。例如Novartis公司与Allergan公司于2017年4月签署了一项协议，测试Allergan的抗炎、抗纤维化的趋化因子受体拮抗剂和Novartis的FXR激动剂联合疗法的效果。

在确定NASH个案的具体发病原因上，研究人员都认为需要开展更多研究——毕竟该领域尚处于起步阶段。Freedman指出，有的患者发病原因可能是微生物群因失调而导致的纤维化，有的患者的发病原因可能是胰岛素抵抗，还有些患者则可能对脂质积聚的毒性作用更敏感。鉴于此，我们需要采用更好的诊断技术来评估发病原因的多样性，并监测患者对治疗的反应。

Day找出，将来需要解决的问题是“你能否在一位患者身上识别病因，然后提出个性化治疗方案？换句话说，有效的NASH治疗需要更加个性化的诊断——这是整个医疗领域的目标，且正在慢慢实现。

未来五年

人们普遍预计NASH的药物——很可能是奥贝胆酸和elafibranor——将在2020年或2021年进入市场，其它药物很快也会跟进。目前的乐观态度可能仅仅反映了该领域流入了巨额资金。但Freedman认为事情没那么简单，从病理学上说，虽然已经有非常可靠的证据表明，现在是开发新药的好时机，但这还只是NASH领域药物开发的早期阶段。

需要注意的是，一些药物仅仅因为能够抑制肝脏炎症和纤维化就被批准销售，这是不够严谨的，我们必须关注这些药物的长期效果，同时追踪疾病进展和用药志愿者的整体健康情况。大多数NASH患者都有相关的几种疾病，

NASH药物不应导致这些并发症恶化。

Sanyal指出，尽管NASH与心血管疾病风险增加之间的关系已被明确，但只有在NASH得到有效治疗之后，才能知道拥有更健康的肝脏是否真的可以降低风险。对NASH的治疗可能反而表明肝病和心脏问题是由共同的风险因素引起的。

很明显，NASH将需要精确的管理。Ratziu表示，药企之间开展了研发竞赛，每个人都想获胜。但重要的是，目光不要太短浅，只在乎一时输赢，这些药物进入市场仅仅是比赛的开始，而非结束。

NAFLD 研究历史

经过几十年的发展，用于治疗NAFLD的药物即将进入临床。



3.2 新型诊断方法



FibroScan设备是一种使用超声波检测肝纤维化的非侵入性工具。

传统的重度脂肪肝检测方法是活检。更简便的检测方法或许有助挽救更多人的生命。

对于一个没有明显疾病迹象的人来说，在他们的肝脏上打一个洞的做法简直让人难以接受。尽管这个孔很小，只有一个空心针头的直径那么大。但是至今，这样的活检方式仍然是肝病学家用来直接评估NASH对肝脏造成的秘密损伤的唯一可靠工具。NASH是NAFLD——一种与肥胖和糖尿病有关的疾病——的严重形式。然而，由于担心安全和不适，一些潜在患者拒绝接受活检。

马萨诸塞州波士顿贝丝以色列女执事

医疗中心（Beth Israel Deaconess Medical Center）的胃肠病专家Michelle Lai指出，很多患者表示他们不想进行活检，并且会尝试减肥。问题是，当他们又一次来到医院时，不但体重没有减轻，而且肝脏风险还上升了。虽然活检手术通常是安全的，但罕见的并发症却可能会非常严重，包括肝脏失控性出血，甚至会导致死亡。据估计，每1万人中有1人会发生并发症。

此外，肝活检也不太适合追踪这种普遍

且难以检测的疾病。在肝硬化发作之前，许多有风险的人基本上都没有症状。巴黎第七大学Beaujon医院（University of Paris Diderot's Beaujon Hospital）的肝病学家Laurent Castera估计，法国有多达25%的人患有某种形式的NAFLD。他指出，法国不但没有足够的肝病专家开展肝活检，而且可以解读肝活检结果的病理学家更少。

这些情况一度让医生陷入困境，但幸运的是，非侵入性的诊断方法很快就要问世了。尽管目前没有一项技术成熟到可以像活检那样提供“是”或“否”的明确答案，但是这些方法为临床医生对NASH的高风险人群进行分流提供了更快、更方便的手段。它们甚至可以被用于大规模的普查，以便在疾病发展之前就可确诊。

新型诊断手段

NAFLD的主要标志是脂肪变性——脂肪

在肝脏中积聚。一些患有此病的人通过一种被称为纤维化的过程后，肝脏出现瘢痕组织。许多人的NAFLD一直停滞在此阶段，但那些继续发展成NASH的人会经历炎症，纤维化程度加深的过程。这可能会导致肝硬化和肝功能衰竭，不过如果能及时发现晚期肝纤维化，则有机会帮助肝脏恢复健康。正如Lai表示，即使在肝硬化早期，体重减轻了，也还是有可能逆转病情的。

过去15年，越来越多的临床医生使用名为FibroScan的非侵入性工具来检测肝纤维化。FibroScan以瞬时弹性成像技术（transient elastography, TE）为基础，使用超声波确定肝脏的僵硬程度。Castera表示，这是一种广泛且易于使用的技术。TE在超过90%的情况下能够正确识别肝硬化，但Castera指出，相比于做出正确诊断，FibroScan在排除严重纤维化或肝硬化方面表现更好。

对于不太严重的肝硬化的诊断，TE可能会产生不可靠的结果。在某些情况下，这是由于其它影响肝硬化的生理因素，包括严重的脂肪堆积，或者在诊断前进食造成的。

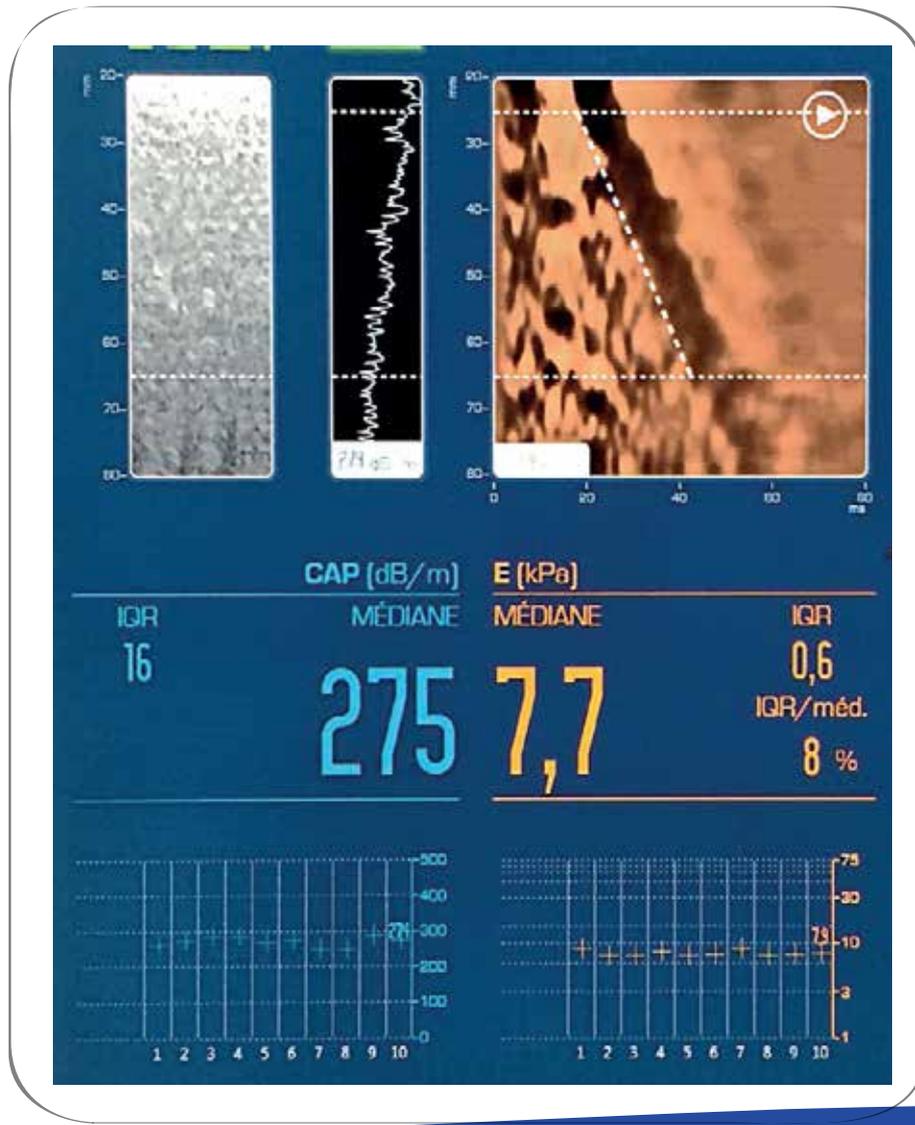
特别值得关注的是，对于NAFLD高风险人群来说，该技术的效果并不明显。据加州大学（University of California）圣地亚哥分校肠胃病学家Rohit Loomba解释，随着体重的增加，诊断更容易出错，当你的BMI指数达到40时，FibroScan诊断的作用就不大了。这在美国是个大问题，因为美国是世界上肥胖率最高的国家之一。FibroScan的加强版本似乎部分解决了这个问题。

为了获得更高的准确性，Loomba赞成采用传统的磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）扫描仪来测量整个肝脏的纤维化程度。Loomba表示，这种被称为磁共振弹性成像（magnetic resonance elastography, MRE）的方法可能是检测晚期肝纤维化和肝硬化的最佳方法。尽管他承认高成本将使其不太可能被广泛使用。然而对非常肥胖的患者进行MRI也可能产生问题，因为需要容纳更大体型的专用仪器。然而，MRE已被证明是临床试验背景下一种非常有潜力的工具，特别是当与另一种基于MRI的质子密度脂肪分离技术（proton density fat fractionation, PDFF）相结合时，它可准确测量脂肪变性。Loomba等人首次证明了两种技术联用的效果，他们用这

两种技术来监测NASH患者对药物依泽替米贝（ezetimibe，一种候选药物）的反应。

即使没有直接观察纤维化造成的损害，临床医生也可以通过使用PDFF或基于超声波的方法监测脂肪变性来获得重要见解。“如果你开始改变生活方式，脂肪变性首先会消失，”巴黎第六大学（Université Pierre et Marie Curie）的肝病学家Vlad Ratziu说。这种效应

在测量肝脏脂肪的量以及衡量患者对治疗产生的响应上非常有用。这种监测也可以帮助确定预后，因为脂肪堆积是肝脏纤维化的元凶。Loomba指出，大约有25项临床研究使用了MRE-PDFF来衡量脂肪肝疾病患者对治疗的反应。他表示，如果患者减少了30%或40%的肝脏脂肪，那么活检时就可以表现为NASH病情的改善。



来自疑似NAFLD患者的FibroScan读数。

血液检测

对于许多疾病来说，血液样本可以为观察身体内部的情况提供有用的窗口。但目前临床医生并不那么相信NAFLD的血液检测。**Lai**表示，他很少使用NAFLD的血液检测，因为他并不相信这些数据。

在基于血液的纤维化监测中最广泛使用的指标是NAFLD纤维化评分。这个指标已经在临床测试中被反复验证，并综合了BMI指数、血糖和肝酶水平的数据。与FibroScan一样，NAFLD纤维化评分最适合揭示谁处于发展状态的最低风险，只有4%的晚期纤维化病例漏诊；其缺点是几乎50%的受试者都会错误地被检测出纤维化。临床医生还设计并验证了几项血液检查，但都并不理想。**Loomba**指出，这些手段的诊断准确率都在80%左右或更低，医生无法根据这些诊断做出临床决策。

目前人们最迫切希望能有一种生物学指标（生物标志物），以区分与脂肪变性有关的轻度纤维化和会导致NASH的更严重和更活跃的纤维化。要发现生物标志物，我们首先要确定脂肪肝疾病的性质，然而这并非易事，毕竟该病具有漫长且复杂的病程。**Castera**指出，首先我们需要通过肝活检来鉴别这些患者，然后进行10、20或30年的随访。要开展这些研究，难度非常大。NASH具有动态性，随内部生理过程和每位患者的生活方式的改变而改变。**Lai**表示，随着人们体重的增加或减少，这种情况往往会不可预测地恶化或减轻，这使得监测具有挑战性。

NASH候选药物的不断增多，促使相关

行业对开发血液检测产生了进一步的兴趣，最终可能帮助药物试验参与者免受多轮活检。例如，位于法国里尔附近的生物制药公司**Genfit**一直在药物**elafibranor**的研究中设计和评估诊断方法。**Genfit**采用的诊断方法是测量血液中能够表征疾病活动性的蛋白和microRNA分子。**Ratziu**认为，丹麦**Nordic Bioscience**公司和纽约**Bristol-Myers Squibb**公司正在开发的血液检测方法都很有潜力。这些检测方法可以检测胶原合成或降解产物，而胶原蛋白在纤维化中起着重要作用。他说，现在的技术可以检测纤维化阶段，但无法表征纤维化的速度。检测胶原代谢的副产品可以提供一些有趣且有前途的指标。他还指出目前有多个多国合作项目专注于寻找血清生物标志物，其中包括一项由创新药物倡议（**Innovative Medicines Initiative**，一个设在布鲁塞尔的公私合作伙伴组织）发起，名为**LITMUS**的欧洲项目。

尽管临床医生习惯于用血液来寻找答案，但身体产生的其它物质也可以提供有用的诊断线索。**Loomba**与加州的**J. Craig Venter**研究所合作，发现粪便可以提供脂肪肝病的信息。该研究小组对86名NAFLD患者的肠道细菌基因组进行了调查，这些患者已通过肝活检确定患有轻度或重度纤维化。结果显示，早期和晚期NAFLD患者的微生物群有明显差异，并且诊断能力比血液测试强大得多。**Loomba**指出，这些检测的准确性让人惊讶。他们在一个独立的肝硬化和对照患者队列中验证了这些诊断方法的有效性，并正在进行验证研究。

大规模筛查

即使这些诊断工具都不能取代活检，但是两种方法的结合却可以帮助临床医生筛查大量有NAFLD风险的个体（主要危险因素已确定）。Loomba指出，如果你患有糖尿病，或者你已经50岁以上，而且还肥胖，那么你就需要接受筛查了。

但一些临床医生认为需要进行更积极的监测。去年11月，Castera等人呼吁筛选普通人群。他表示，我们可以从生物标志开始筛查，因为对大量人群进行血液检测相对容易，并且可以排除大多数没有风险的人；然后通过TE进一步筛查，最后进行活组织检查。Castera引用了一项筛查研究，表明5.6-7.5%的公众可

能有肝纤维化而不自知——并且这些人中有0.6-0.7%已经显示出肝硬化的体征了。他指出，许多全科医生，甚至肥胖和糖尿病专家可能都没有意识到他们的患者具有罹患严重肝损伤的风险。

Loomba认为，建立对肝脏健康的认知非常重要，他指出NASH的重要易感因素越来越明确——例如如果有直系亲属患有NAFLD相关的肝硬化，那么该个体的NASH风险增加12倍。Loomba不想等患者死于肝硬化或者发展成肝癌才发现肝脏问题，他建议现在就要开始筛查。我们可能还没有一个完美的生物标记，但警惕性非常重要。

原文检索：

SARAH DEWEERDT. (2017) Divergent paths. *Nature*, 551: S92-S93.

ANDREW SCOTT. (2017) Menace in the microbiota. *Nature*, 551: S94-S95.

BIANCA NOGRADY. (2017) A growing concern. *Nature*, 551: S96.

LIAM DREW. (2017) SPRINT FINISH. *Nature*, 551: S86-S89.

MICHAEL EISENSTEIN. (2017) Missing the point. *Nature*, 551: S90-S91.

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

热点

CRISPR-Cas技术
必将引领
遗传工程学的未来

CRISPR-Cas技术因多样性、模块化和高效等优势正在引领着下一场生物技术革命。由RNA介导的Cas酶已经成为了很好的基因组编辑工具，可应用于体外培养的细胞、活体动植物等诸多生物对象，也加速了相关基础研究的步伐，同时在临床医疗和农业等方面，也催生了诸多重大科研突破。接下来，我们将从最基础的层面，向您介绍CRISPR-Cas技术相比其它基因编辑技术的优势，并重点介绍该技术的多样性和自然进化性。我们还将介绍进展迅速的各种CRISPR-Cas应用，包括基因编辑（gene editing）、转录调控（transcriptional regulation）、成像（imaging）和诊断（diagnostics）等。CRISPR-Cas技术在核酸操纵（nucleic acid manipulation）方面的最新应用正在改写整个生物学的历史。

科研人员一直都希望找到一种高效的核酸（DNA和RNA）操纵工具，来修改基因，改变其功能。虽然借助遗传扰动（Genetic perturbation），科研人员可以认清基因的功能，也可以修正突变的基因，但是由于技术水平所限，很难精确地对特定的核酸位点进行操作，所以这项工作常常会失败。对于真核细胞的染色体，我们可以利用促使双链DNA发生断裂的方法，实施靶向基因编辑（Targeted gene editing）操作。但是，在蛋白质与DNA之间的识别方面，还是存在问题的。到目前为止，我们已经迎来了好几位核酸结合蛋白，比如锌指蛋白、TALEN蛋白，以及归巢核酸内切酶（meganucleases）蛋白等，这些蛋白的出现推动了核酸编辑领域的发展。不过近6年

来，CRISPR-Cas系统彻底改变了这个领域，带来了革命性的突破，因为该技术可以在非常简单的小RNA分子的引导下，就完成对DNA靶标的识别。该技术的出现给科研人员提供了一个非常棒的机会，可以帮助我们治愈遗传性疾病，或者引入目标遗传性状，以及对活体细胞进行成像，进行高通量功能基因组筛查或现场诊断（point-of-care diagnostics）等。我们将在本文对CRISPR-Cas系统的基本机制和相关应用做一个总结。这场技术革命已经超出了原本的范围，拓展到了除精准基因编辑领域之外的很多其它领域。我们建议读者阅读更多最近发表的综述，以便对CRISPR-Cas技术在分子生物学界的影响力，以及众多的CRISPR-Cas应用有更加清晰和准确的认识和了解。

各种RNA调控的CRISPR-Cas酶

CRISPR-Cas系统其实是微生物以自身RNA为“向导”，而发挥作用的一种适应性免疫机制（adaptive immunity），它可以对外源性的核酸进行结合、切除和降解，保护微生物免受外源病原体的侵害（图1）。微生物经过一个适应过程（adaptation），可以将原来的遗传物质片段纳入自己的CRISPR“数据库”

当中。这些CRISPR“数据库”转录之后，就形成了CRISPR RNAs（crRNAs）库。这些RNA分子都能够与Cas酶结合，以碱基互补配对的方式对DNA进行精准的识别和结合。在各种天然的CRISPR-Cas系统中，这些由RNA分子引导的Cas酶就可以对目标DNA分子进行精确的干扰和切割。

Cas9蛋白（也是第一个被用于基因组编辑的核酶）具有几大特征，因此能够实现高效、精准的基因组编辑功能（图2A）。Cas9蛋白只能通过特异性识别crRNA与反式活化crRNA（trans-activating crRNA, tracrRNA）的结合，与目标向导RNA分子特异性结合。此外，crRNA-tracrRNA分子还可以与嵌合的ssRNA（chimeric single-guide RNA）融合，形成一个包含了Cas9和ssRNA的、有两个组分的复合系统。最后，与附近有PAM特异性基序（protospacer adjacent motif）的靶标DNA稳定的结合，继而激活Cas9酶活性，切割靶标DNA分子，形成双链DNA断裂缺口。全世界的科研人员都在使用Cas9蛋白，就因为这种酶具有可控的酶活性，而且只需要改变sgRNA结合区域，就可以重新使用，非常方便。

虽然化脓性链球菌（*Streptococcus*

pyogenes）的Cas9蛋白SpCas9仍然是目前最常用的Cas9蛋白，但它绝不是该领域里唯一的Cas9蛋白。细菌和古细菌（archaea）进化出了大量的、功能各异的CRISPR-Cas系统，不过全都保留了SpCas9最重要的、可调控特性。科研人员已经了解了2类CRISPR-Cas系统的进化多样性特点，获得了各种SpCas9同源，或变异体蛋白。在2015年末，2类CRISPR-Cas系统里又新增了一个成员，即2类5型CRISPR-Cas12a系统和2类6型CRISPR-Cas13a系统（图2B和C）。现在，SpCas9蛋白已经成为了包括各种同源蛋白、DNA特异性Cas12蛋白和RNA特异性Cas13蛋白在内的一个大家族，所有这些蛋白都是可以被RNA介导的，可调控的核酶蛋白。这种可调控性（programmability）存在于各个系统中，这也极大地拓展了CRISPR-Cas系统的应用范围。

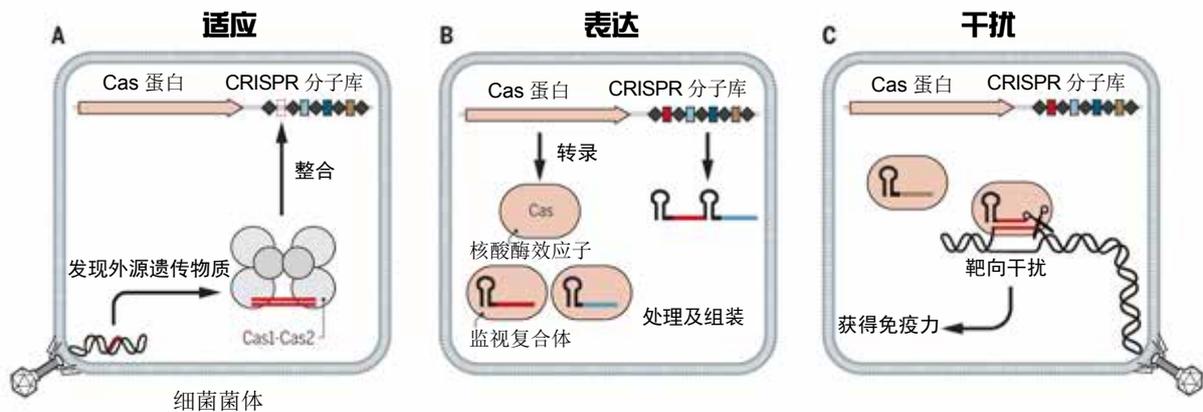


图1 CRISPR-Cas适应性免疫机制。（A）细菌菌体内的Cas1-Cas2蛋白捕获外源遗传物质之后，将其整合进细菌菌体的CRISPR分子数据库中，这个过程称作“适应”。（B）CRISPR数据库及其相应的Cas蛋白被转录、表达。Cas酶与crRNA结合形成监视复合体。（C）Cas酶通过监视复合体里的crRNA与外源遗传物质互补结合，破坏外源物质，细菌菌体获得免疫保护。

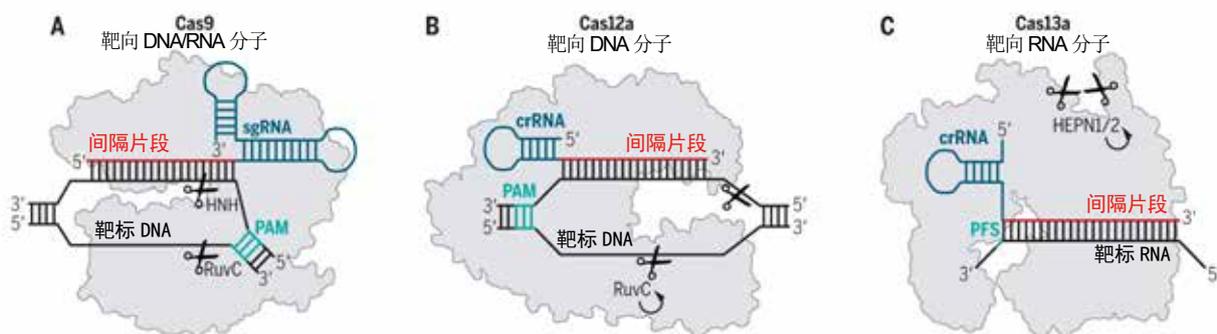


图2 2类CRISPR-Cas系统作用机制图解。(A) 2类2型CRISPR-Cas9系统 (Class 2 type II CRISPR-Cas9) 主要由一个sgRNA (蓝色) 编码的一个间隔片段 (红色), 与附近有PAM基序 (青色) 的靶标双链DNA (黑色) 结合。正确结合之后, HNH和RuvC核酶结构域被激活, 切断双链 (剪刀形状)。(B) 2类5型CRISPR-Cas12a系统由一个crRNA (蓝色) 编码的间隔片段 (红色) 与附近有PAM基序 (青色) 的双链靶标DNA (黑色) 互补结合。正确结合之后, RuvC核酶结构域被激活, 以多次转换的通用ssDNase活性 (箭头) 切断双链 (剪刀形状)。(C) 2类6型CRISPR-Cas13a系统由一个crRNA (蓝色) 编码的间隔片段 (红色) 与靶标RNA (黑色) 互补结合。正确结合之后, HEPN核酶结构域被激活, 表现出ssRNase活性 (箭头)。也可见背景知识框1。

背景知识框1: 2类CRISPR-Cas系统速成

(A) 2类2型CRISPR-Cas系统主要针对dsDNA靶标分子。该系统由Cas9核酶和一个由crRNA及tracrRNA融合而成的sgRNA组成。sgRNA与靶标DNA序列附近的PAM基序互补结合, Cas9核酶也借此结合到靶标DNA分子上。一旦碱基正确配对结合之后, Cas9核酶里的RuvC和HNH核酶结构域就会被激活, 切割靶标及非靶标DNA链。(B) 2类5型CRISPR-Cas系统主要针对ssDNA和dsDNA分子, 由Cas12a核酶 (以前称作Cpf1蛋白) 和一个crRNA分子组成。crRNA与靶标DNA序列附近的PAM基序互补结合, Cas12a核酶也借此结合到靶标DNA分子上。一旦碱基正确配对结合之后, Cas9核酶里的RuvC核酶结构域就会被激活, 表现出单链DNA酶活性, 切割靶标及非靶标DNA链, 及反式单链DNA底物 (trans-ssDNA substrate)。(C) 2类6型CRISPR-Cas系统主要针对ssRNA分子, 由Cas13a核酶 (以前称作C2c2蛋白) 和一个crRNA分子组成。crRNA与靶标RNA序列互补结合, Cas13a核酶也借此结合到靶标RNA分子上, 一旦碱基正确配对结合之后, Cas9核酶里的HEPN核酶结构域就会被激活, 表现出dsRNA酶活性。

Cas蛋白介导的基因组编辑应用

虽然Cas蛋白的应用范围一再被扩大，但是精确的基因组改造依旧是CRISPR技术最主要的应用领域。Cas9和Cas12a蛋白都是由RNA分子介导的核酶，能够在基因组里特定的位点产生双链DNA断裂缺口，完成基因组编辑工作（图3）。非同源末端连接（non homologous end joining, NHEJ）或者同源介导修复（homology-directed repair, HDR）这些细胞DNA修复机制在修复这些双链DNA断裂缺口的同时，就会完成基因组编辑工作。

作为一种精准的基因组编辑工具，Cas9及Cas12a蛋白都可以应用于多种细胞和生物。这种技术也催生了全基因组筛查（genome-wide screen）技术，可用于了解最基本的生物功能，针对复杂的遗传性疾病确认潜在的药物作用靶点。在农业领域，该技术已经成为了市面上最主流的转基因农作物制备技术。在临床治疗领域，该技术可用于治疗病因明确的遗传疾病，也可用于高通量DNA测序和个体化医疗等诸多方面。目前研究人员已经在动物实验中，使用该技术治疗杜氏肌营养不良症（Duchenne muscular dystrophy, DMD），并取得了良好的治疗效果。其基本治疗思路就是利用CRISPR-Cas技术纠正致病突变，或者引入错位突变（skipping），使致病外显子失效。Cas9蛋白还被用于灭活多种与神经疾病有关的缺陷基因，以治疗肌萎缩侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）或亨廷顿氏病（Huntington's disease）等疾病。科研人员还使用Cas9蛋白彻底清除人体非整倍体多潜能干细胞（aneuploid human pluripotent stem cell）里多余的染色体，或者使猪体内源性的逆转录病毒失活，以及制备CAR-T细胞等工作。此外，Cas9蛋白已经

被批准用于纠正镰刀型细胞贫血（sickle cell disease）的遗传致病突变。人们目前已针对这类疾病建立起可纠正遗传致病突变基因的相应的操作规程。除了这些针对体细胞的应用之外，研究人员也在计划针对生殖细胞进行遗传学治疗，不过这也引起了伦理和社会方面的担忧。

虽然CRISPR-Cas技术看起来已经非常强大了，但我们还是有必要提醒一下，基因组精确编辑依旧没那么完美，尤其是NHEJ修复机制虽然效率更高，但是我们其实更需要的是利用HDR修复机制进行的基因组编辑，尽管这种方法的效率没那么高。还有一种使用Cas蛋白的策略，那就是在这些蛋白上融合其它效应因子，比如碱基编辑器（base editor），以减少非目标编辑事件的发生，同时也可以减少对修复模板的依赖。例如Cas9核酸内切酶（nickase Cas9, nCas9）可以将单碱基编辑器引入特定的位点，进行碱基编辑，而不需要切断DNA双链，再进行修复、编辑（图3）。最近，我们又迎来了一位新的碱基编辑高手——脱氨酶（deaminase）。当它与nCas9搭配使用，我们便可以将碱基A转变成碱基T，碱基G转变成碱基C。各种碱基编辑器可以帮助科研人员在目标靶点处，让ATGC这四种碱基相互自由完成任何的转换。虽然，单碱基编辑器为我们提供了另外一种方法，不需要切断DNA双链就能完成基因编辑，纠正致病突变，但我们还需要进一步改进这种技术，尽可能地减少脱靶情况的发生。新一代Cas基因组编辑大军里肯定会包括碱基编辑器，最理想的碱基编辑器应该是在Cas蛋白与DNA结合之后，通过构象改变来激发出碱基编辑活性。

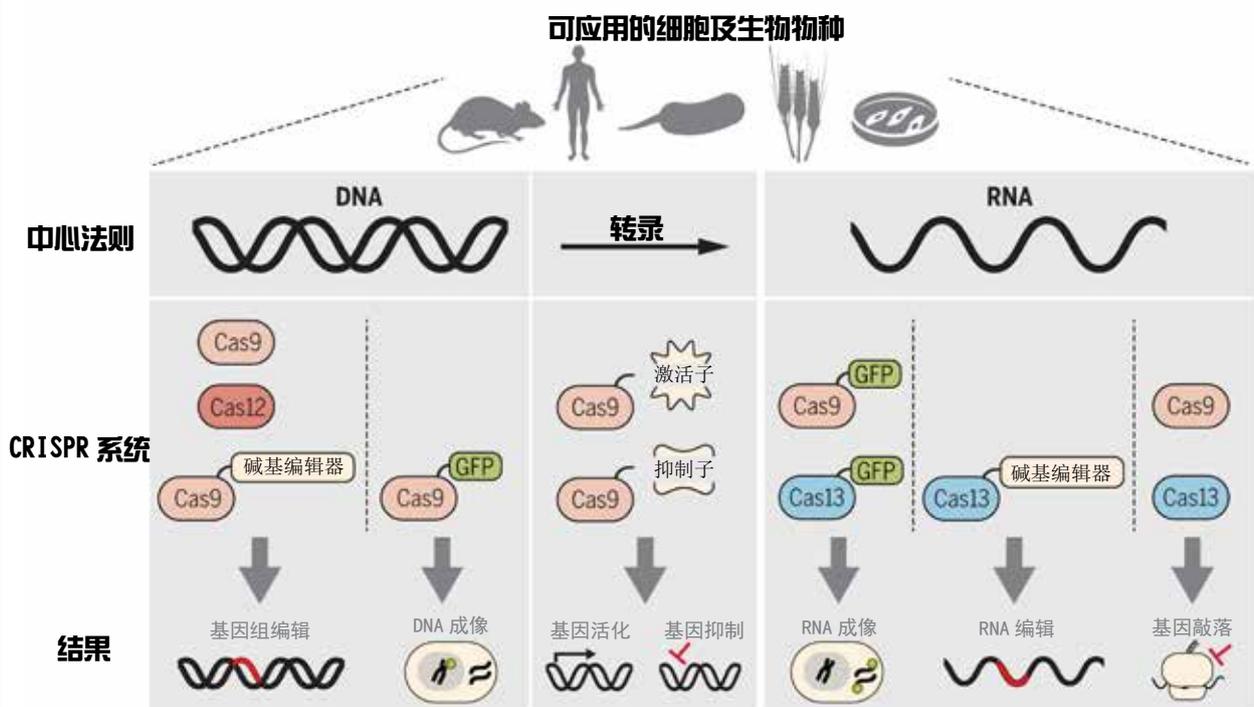


图3 CRISPR-Cas系统在中心法则各个阶段的应用实例。上图从左至右，使用Cas9蛋白和Cas12蛋白形成了双链DNA断裂缺口，用于完成基因组编辑工作。nCas9蛋白可与碱基编辑器融合，在不形成双链DNA断裂缺口的情况下对核酸进行修改，完成基因组DNA编辑工作。dCas9蛋白能够与转录激活因子、抑制因子和表观遗传学修饰因子等各种调控因子融合，对基因转录进行调控。Cas9和Cas13a蛋白可用于对RNA靶标分子进行干扰。Cas13a蛋白与碱基编辑器结合之后，可对RNA分子里的碱基进行修饰。dCas9或dCas13a蛋白与GFP蛋白融合之后，可以实施DNA或RNA成像操作。

用dCas9蛋白进行转录调控

Cas9蛋白是一种模块化的平台，既具备DNA结合活性，也具备核酶活性。如果通过人工诱变的方式使Cas9蛋白里的核酶结构域失活，那么就会得到只具备DNA结合活性，而没有催化活性的dCas9蛋白（catalytically deficient Cas9, dCas9）。这些dCas9蛋白可以将蛋白质或RNA等组分引入基因组的特定位点，在不改变DNA序列的情况下，影响基因的

转录，发挥转录调控的作用（图3）。dCas9蛋白的出现也彻底改变了功能基因组筛查工作（functional genetic screening），能够对多种细胞（包括免疫细胞和神经元细胞）实现快速、特异性和多重基因敲落操作。这也减少了对DNA损伤的担忧，可以在模式生物里进行药物开发。比如，在神经元细胞实验和小鼠动物模型试验中均发现，将dCas9蛋白与

TET1这种组蛋白去甲基化酶（demethylase）融合，就可以纠正失调的*FMR1*基因位点，逆转脆性X染色体综合症（fragile X syndrome）的症状。功能获得试验（Gain-of-function study）也成功地利用修饰的dCas9靶标基因活化系统（modified dCas9target gene activation system）治疗了1型糖尿病、急性肾损伤和小鼠肌营养不良等多种疾病。对细胞进行抑制子筛选（suppressor screen）和合成致死筛选（synthetic lethal screen）均能够以前所未有的速度帮助我们发现基因的功能、

效应子之间的相互作用和信号通路等信息。不过还存在一些挑战，比如dCas9蛋白与效应子融合之后会产生复杂的脱靶效应，这主要是因为融合之后的催化结构域可能会靶向其它邻近的区域，或者其它无关的区域。此外，染色质的不可预计的位点特异性效应（locus-specific effect），以及后续对转录的影响都会增加我们分析的难度，让我们更难明了真正的原因。将来，还需要用系统性的验证手段，对这些非目标的效应进行更加精准的调控，进一步提高特异性。

利用靶向RNA分子的Cas蛋白对转录后阶段进行改造

Cas蛋白效应子作为一种非永久性基因改造方法，也可以直接靶向RNA分子，暂时发挥转录组调控的作用（图3）。使用呈现PAM的寡核苷酸片段（PAM-presenting oligonucleotide, PAMmer）将SpCas9蛋白改造之后可以打造出一套可调控的RNA靶向系统，这就是靶向RNA的Cas9蛋白——RCas9（RNA-targeting with Cas9）。这些RCas9蛋白可以清除致病的RNA位点、修复mRNA剪切障碍，并减弱CAG重复序列表达含有多聚谷氨酰胺（polyQ）的蛋白质。到目前为止，RCas9蛋白家族已经包括了不依赖PAM序列的蛋白。Cas9蛋白既往的巨大成功，促使它进一步在转录后阶段继续表现出惊人的潜力，比如与单碱基RNA修饰因子结合，从而实现RNA定点编辑功能。

目前Cas蛋白业已成为了非常好的RNA靶向工具（RNA targeting）。在大肠杆菌里表达的重组Cas蛋白也用来构建了6型RNA

引导的通用型RNA酶（RNA-guided general ribonuclease）。Cas13a蛋白还被用于哺乳动物或植物细胞的体内实验，进行特异性的基因敲落。Cas13b蛋白与Cas13a蛋白在进化和功能上都有非常紧密的关系，因此也具备可调控的RNA酶活性，可用于哺乳动物细胞的RNA干扰实验和RNA编辑实验（图3）。最近，人们又开发出了CRISPR-Cas13d系统，用于开展体内剪接体的编辑工作。Cas9和Cas13这类RNA靶向系统除了应用于临床，比如使用反义寡核苷酸治疗急性非孟德尔氏病（acute non-Mendelian pathologies），以避免彻底改变DNA序列带来的风险之外，还可以帮助我们开展靶向RNA引导的研究。不过，我们未来还需要进一步弄清楚这些靶向RNA的Cas效应因子是如何与RNA发生相互作用的，以及Cas蛋白在体内切割反式RNA的效率又是为何会降低的。

在可编程核酸成像方面的应用

mRNA、非编码RNA等核酸分子在核内进行正确的时空定位，是确保它们发挥正常功能的关键，一旦出现失调，就会导致疾病发生。现有的活体细胞核酸（基因组位点及新生RNA）成像技术还不够完善，主要受限于相关工具蛋白和特异性序列的导入等问题。不过，科研人员利用dCas9蛋白，将其与荧光报告蛋白融合，开发出了一种可对活体细胞内基因组中的重复片段进行成像的新技术（图3）。由于dCas9蛋白对PAM序列的识别具有超强的严谨性，因此，也可以对活体细胞进行高分辨率的单核苷酸多态性（high-resolution single-nucleotide polymorphism）研究。不过，想要广泛使用dCas9蛋白开展基因组特异性位点的定位研究，尤其是针对非重复序列的研究，还存在一个问题，那就是信噪比太低。有一种方法可以解决这个问题，那就是利用多种

噬菌体的MS2操纵子RNA发卡结构，将其与sgRNA融合。这些串联起来的MS2基序具有非常高的亲和力，能够招募不同的MS2基序结合蛋白，再融合一个荧光报告蛋白，就能有效地提升dCas9-sgRNA与活体细胞DNA结合时的信噪比。RCas9蛋白也可以对活体细胞里的RNA分子进行跟踪，帮助我们实时观察具有临床意义的RNA的变化情况（图3）。随着RNA介导的RNA靶向工具的不断增多，RNA成像工具的队伍，比如没有催化活性的Cas13a蛋白dCas13a也在不断壮大。虽然RCas9和dCas13a对重复序列的识别能力都非常不错，但我们还需要开发出更多的、可识别低丰度的和非重复序列的新工具。而且，我们也还不清楚让那些大型的、外源性的核糖核蛋白体与细胞的RNA结合，是否会影响细胞的正常功能。

在检测核酸和诊断方面的应用

Cas13a及Cas12a蛋白的RNA介导的核酶活性也可用于核酸检测工作。Cas13及Cas12a蛋白在功能上均与Cas9蛋白明显不同。一段特异性的核酸分子与Cas13及Cas12a蛋白的向导RNA配对结合之后，就能激活这两种蛋白的 multiple-turnover核酶活性。这是因为这种可调控的核酶活性让Cas13a蛋白成为了第一个在众多RNA分子中检测目标RNA分子的工具。以这个为基础，人们又开发出了特异性高灵敏度酶报告因子解锁系统（Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing,

SHERLOCK）。这是一种易于操作的、纸媒的、高灵敏度的检测技术。生物化学分析发现，不同的Cas13a同源蛋白具有不同的crRNA及底物偏好性，因此，可以正交使用（orthogonal use），同时检测两种不同的RNA转录产物。Cas13b蛋白家族的情况也一样，基于此也开发出了SHERLOCKv2系统，能够同时检测登革热病毒和寨卡病毒。

与Cas13蛋白类似，Cas12a蛋白也进化出了一个功能上非常保守的核酶开关，但是能够触发开关的是ssDNA分子。DNA内切

核酸酶靶向的CRISPR反式报告系统（DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter, DETECTR）也因此应运而生，可用于DNA的检测和临床诊断等工作。只要将DETECTR系统与恒温的预扩增（isothermal pre-amplification）程序结合起来，就能快速、准确地检测HPV病毒等病原微生物。SHERLOCKv2系统与以Cas12a蛋白为基础的DNA检测技术相结合，就可以发现绿脓杆

菌（*Pseudomonas aeruginosa*）和金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的DNA和RNA分子。与Cas13蛋白的工作一样，通过对Cas12蛋白系统的分析也发现，Cas12蛋白也可能存在多种不同的功能变体，能够开发出更多的DNA检测技术。将来，利用CRISPR-Cas技术检测特定的核酸靶标一定会成为临床上快速、准确的诊断手段，从而进一步降低床旁诊断（point-of-care diagnostics）的费用。

细胞内特异性传递CRISPR-Cas系统

与非目标核酸的结合、编辑和切割，是所有遗传改造技术都必须解决的大难题。与小分子药物或抗体类药物的脱靶效应引起的副作用相比，Cas蛋白的脱靶效应危害更大，因为它会对DNA造成永久性的改变。实际上，这也更进一步凸显了核酶的特异性，以及靶向性的重要地位。科研人员已经在Cas酶及sgRNA的开发和改造方面取得了不错的进展，进一步提高了核酶的特异性。此外，更准确的预测实验结果，对基因的时空调控做到更加精确，也能够降低脱靶效应。同时，人们也在研究细胞的DNA修复机制，以获得更好的基因组编辑结果。

改进载体，以便更高效、更加特异性地向胞内递送Cas蛋白，目前还不是一件容易的事，这是因为sgRNA和Cas9蛋白很容易引发人体的免疫反应。在实验室内，科研人员可通

过多种递送方法，比如电穿孔、转染、直接注射和利用病毒载体等将编码Cas蛋白的DNA、mRNA、sgRNA和外源核酸片段，甚至已经组装好的RNP导入细胞。可不幸的是，这些方法都很难在临床上开展，而且各种疾病对Cas蛋白导入的效率要求也都是各不相同的。此外，Cas核酶这种体积较大的蛋白与向导RNA结合之后，如何被包装进病毒载体也是一个难题。有一种方案就是利用体积更小的Cas同系物，或者缩小整个系统，以便“塞进”病毒载体，或者使用纳米材料。最近的研究发现，直接将含有Cas9-sgRNA系统的纳米颗粒注入细胞，能够有效纠正小鼠动物模型的DMD致病突变，并改善症状。由此可见，如果要将CRISPR应用于临床治疗工作，我们还需要开发出更好的载体系统。

总结及展望

CRISPR-Cas技术已经向我们展现出它在多个方面的实力和巨大的潜力，能够以方便、可改造的方式，对基因组进行改造、调控和可视化研究，在多个不同的生物研究和生物技术应用领域里大有可为。各种CRISPR-Cas工具的出现也极大地推动了科学研究的发展，让我们了解了以前未曾研究过的生物，也发现了很多新的致病基因。CRISPR-Cas技术的发展速度也非常快，有好几个以Cas9蛋白为基础的

临床实验已经在开展之中，或者即将开展，这些实验的结果也将指引体细胞编辑技术未来的应用。除了在临床医学方面的应用之外，CRISPR-Cas9技术在农业上也有很好的前景，目前人们已经针对不同的市场开发出了多种产品，美国农业部也因此修改了他们的管理规定。这些成功的案例进一步巩固了CRISPR-Cas技术在最前沿的基因组编辑，以及各种遗传工程学领域里的地位。

原文检索：

Gavin J. Knott and Jennifer A. Doudna. (2018) CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361: 866–869.

Eason/编译



BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix

抗体修饰法 real-time PCR 预混检测液 **6折**

- 新型抗体修饰 BlazeTaq™ 热启动 DNA 聚合酶，只需 95 °C 预变性 30 s 即可使酶完全被激活
- 灵敏度高：可检测低至 5 个拷贝数的 DNA 模板
- 特异性强：有效抑制引物二聚体以及非特异性扩增的产生
- 扩增效率高：在宽广的 GC 含量范围内能维持高扩增效率

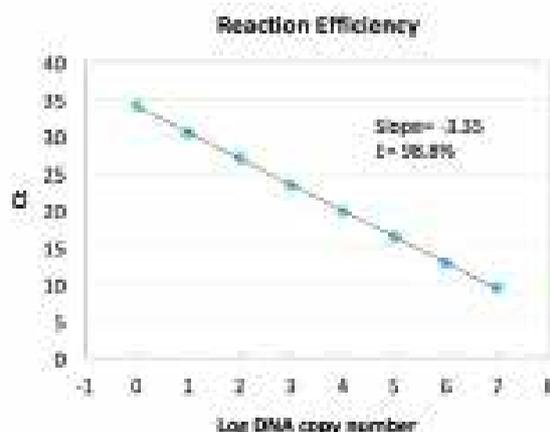
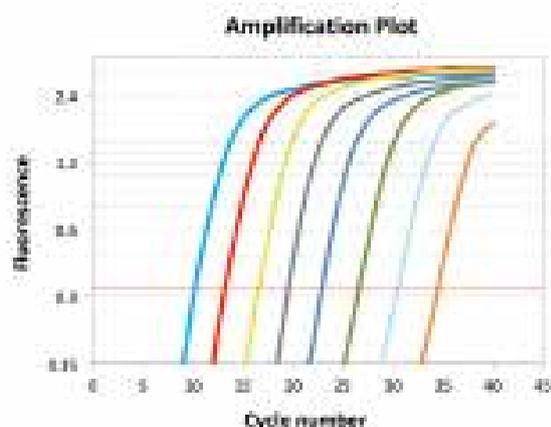


图 1. 使用 BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix 扩增 8 个 10 倍梯度稀释的克隆 DNA 片段，DNA 拷贝数范围为 5×10^7 - 5 个拷贝。该数据显示出高灵敏度的特性，且在宽广的定量范围内具有优异的线性相关性。

BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix 产品列表

产品名称	货号	规格	原价	优惠价
BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix (with ROX)	QP051	20 μL×200 rxns	¥ 555	¥ 353
	QP052	20 μL×500 rxns	¥ 1550	¥ 948
	QP053	20 μL×1200 rxns	¥ 2997	¥ 1793
BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix (without ROX)	QP061	20 μL×200 rxns	¥ 555	¥ 330
	QP062	20 μL×500 rxns	¥ 1550	¥ 948
	QP063	20 μL×1200 rxns	¥ 2997	¥ 1793

qPCR 试剂

灵敏度高、特异性强、性价比高

mRNA 定量检测 *Hot!*

BlazeTaq™ <i>New!</i>	vs	All-in-One™
抗体修饰	Taq 酶的操作方法	化学修饰
30 s	Taq 酶的孵育时间	10 min
★★★	特异性	★★☆
可检测低至 5 个拷贝数的 DNA 模板	灵敏度	可检测低至 5 个拷贝数的 DNA 模板
★★★	性能稳定性	★★☆

产品名称	货号	规格	目录价	优惠价
BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix	信息请见另一页			
All-in-One™ qPCR Mix	QP001	20 μ L*200 rxns	¥ 565	¥ 333
	QP002	20 μ L*600 rxns	¥ 1580	¥ 948
	QP003	20 μ L*1200 rxns	¥ 2997	¥ 1798
All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	QP006	20 RT rxns	¥ 360	¥ 216
	QP007	60 RT rxns	¥ 795	¥ 477

miRNA 定量检测 *Hot!*

产品名称	货号	规格	目录价	优惠价
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	QP015	20 RT+200 qPCR	¥ 2380	¥ 1904
	QP016	60 RT+600 qPCR	¥ 5920	¥ 4736
All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit	QP013	20 RT rxns	¥ 1380	¥ 1104
	QP014	60 RT rxns	¥ 3160	¥ 2528
All-in-One™ miRNA qPCR Kit	QP010	20 μ L*200 rxns	¥ 1100	¥ 880
	QP011	20 μ L*600 rxns	¥ 3135	¥ 2508
	QP012	20 μ L*1200 rxns	¥ 5940	¥ 4752
RNAzol RT RNA Isolation Reagent	QP020	50 mL	¥ 800	¥ 640
miRNA Universal Adaptor PCR Primer (下游通用引物)	QP029	20 μ L*250 rxns	¥ 600	¥ 528

客户发表文章举例

- *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. 2017. *Cell*, IF 30.41. All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit.
- Extracellular matrix scaffolding guides tumor elongation by inducing anisotropic intercellular mechanical tension. 2016. *Nature Cell Biology*, IF 20.06. All-in-One qPCR Mix.
- A mouse model of MYCN-driven retinoblastoma reveals MYCN-independent tumor reemergence. 2016. *Journal of Clinical Investigation*, IF 12.784. All-in-One qPCR Mix.

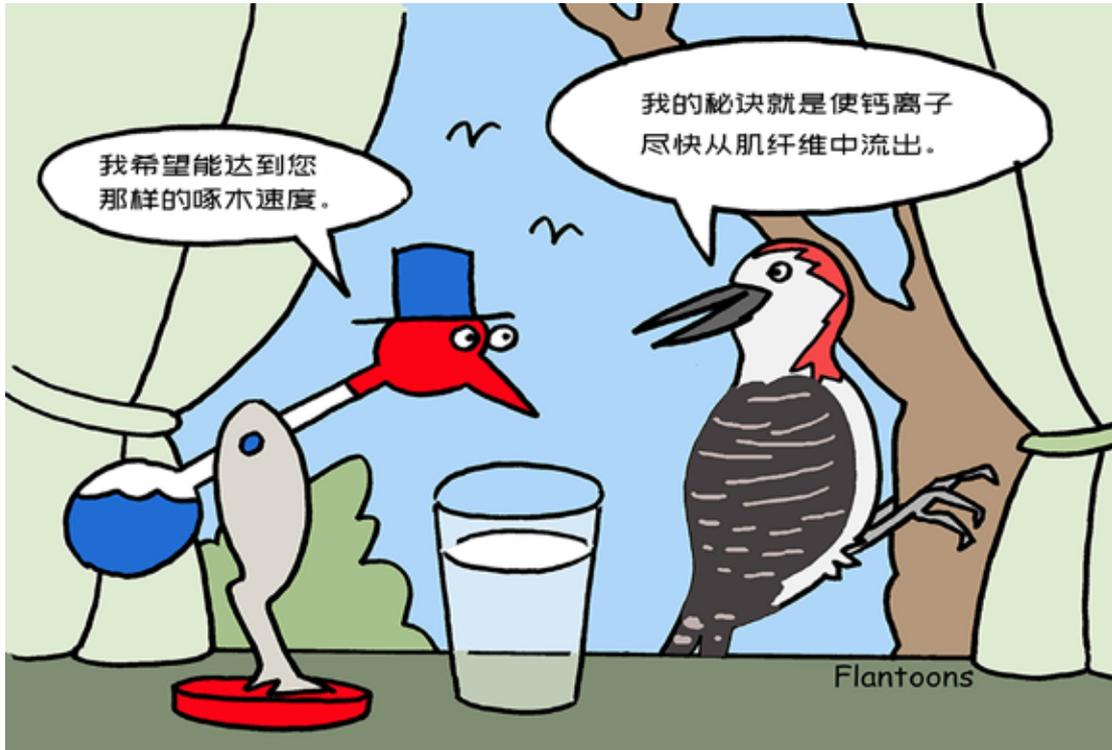


扫一扫，关注我们



百态

摇滚打击乐手
啄木鸟的秘诀：
快速钙循环



想要引人注目，击鼓是绝好办法。2017年，Siddharth Nagarajan以一分钟击鼓2109次创造了世界纪录，并保持至今，可谓吸引眼球的最佳诠释。不过，想象一下，要是用头来完成这种事情……你觉得可能吗？如果访问啄木鸟，它们会用行动表示没问题。据美国维克森林大学（Wake Forest University）的Matthew Fuxjager称，啄木鸟能以每秒16-17次的速率啄击树木，这意味着控制该动作的颈部肌肉必

须以大约50-60 ms的周期前后摆动。这实在是太惊艳了！这些鸟界的打击乐手到底是怎么做到的？Fuxjager与同事Eric Schuppe和John Petersen致力于研究能使啄木鸟的颈部肌肉快速放松和收缩的机制。众所周知，神经信号能激活钙离子的释放，使其进入肌纤维，引起肌肉收缩。因此，三人对mRNA的产物进行了探究，以期了解能使钙离子流回肌浆内质网并储存（导致肌肉松弛）和释放（导致肌肉收缩）

的蛋白质。

研究小组在美国北卡罗纳州捕捉了一些红腹啄木鸟，测量其体内的3种mRNA分子数量，它们分别编码3种研究小组重点关注的位于啄木鸟颈部肌肉的蛋白质。这样，若要支持啄木鸟快速啄木，其颈部肌肉中含有上述基因的mRNA数量就应该极为丰富。结果令人瞩目，编码其中两种蛋白质（小清蛋白和肌浆内质网中的钙离子ATP酶，均能迅速将钙离子储

存起来）的mRNA在啄木鸟的颈部肌肉中含量明显较高；而编码内质网钙通道蛋白（促使钙离子释放到肌肉）的mRNA则未见增加。

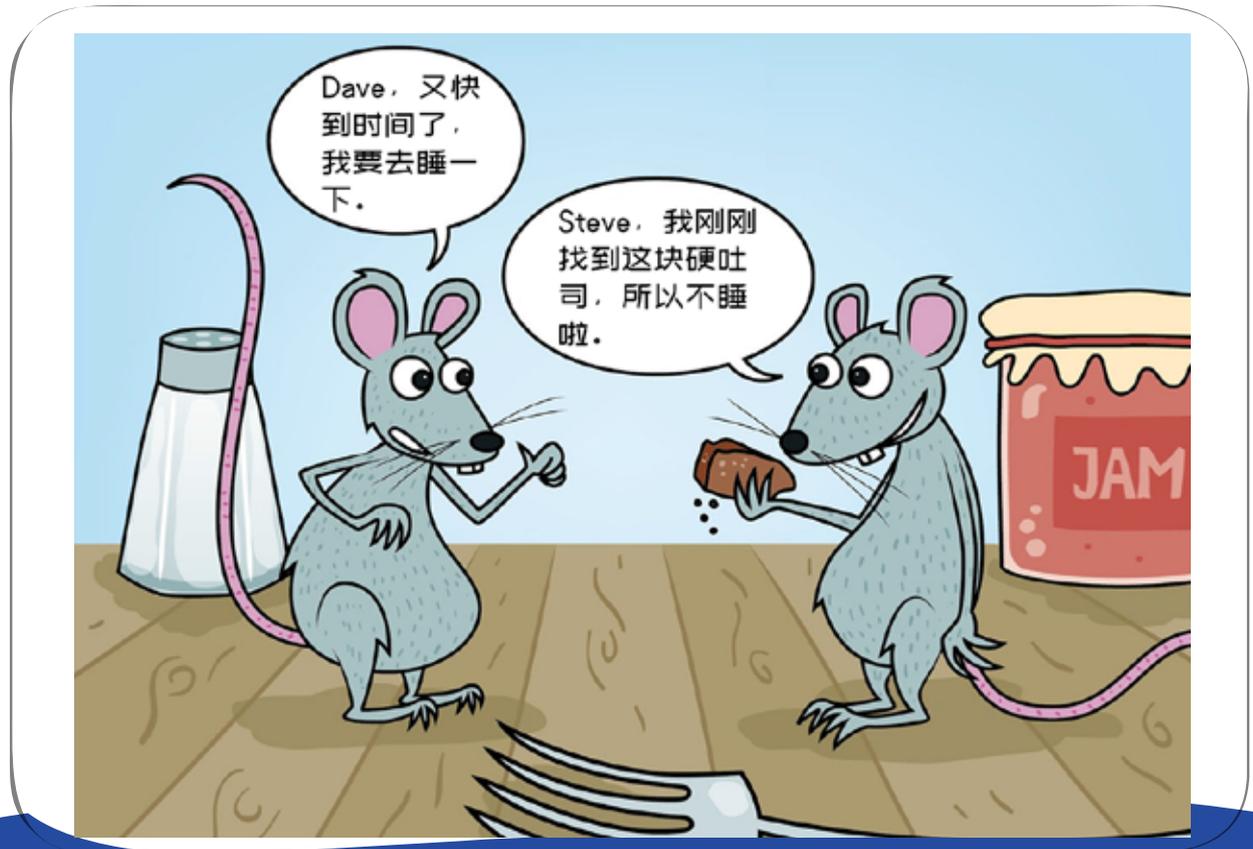
对此，Fuxjager表示，啄木鸟选择的啄木行为驱动钙离子处理机制的进化，进一步支持了啄木鸟的啄木行为。那么，Nagarajan的轻快手指背后是不是也有钙循环的秘密呢？要是真有，岂不是太有趣了！

原文检索：

Schuppe, E. R., Petersen, J. O. and Fuxjager, M. J. (2018). Woodpecker drumming behavior is linked to the elevated expression of genes that encode calcium handling proteins in the neck musculature. *J. Exp. Biol.* 221, jeb180190.

文佳/编译

生物钟调节冬眠小鼠的节能模式



任何会看暖气账单的业主都会告诉你一条真理，暖和是要付出代价的，如果燃料源头不那么可靠，就得时不时把暖气开小一点。这条真理同样也适用于小动物。当食物匮乏时，有些动物就会降低体温，以减少能量消耗，甚至可达90%，这个过程就是我们所知的冬眠。许多动物都会遵循严格的计划安排，在深夜至

清晨时段降低体温。目前，人们还不清楚动物如何控制这种节能式体温下降的时机，但科学家曾提出，它们可能利用了内在的生物钟或餐后计时功能进行调节。为了了解真正的机制，美国麻省医学院（Massachusetts Medical School）的Vincent van der Vinne和David Weaver联合美国威廉姆斯学院（Williams

College) 的Steven Swoap共同进行测试, 观察饥饿的家鼠在进食时间改变的情况下, 何时开始降低体温, 以保存能量。

家鼠的生物钟非常精密, 在其睡眠的7个小时内也能正常运作。鉴于此, 研究小组在一个完全黑暗房间里监测小鼠的体温和活动模式, 仅在每天下午6点给予它们少许食物。这样, 小鼠在几天内就进入了常规的冬眠程序——在进食后体温下降长达4小时。接着, Mark Bingaman和Swoap改动了供食时间, 即每20小时给予一次食物。这样, 每天的进食时间提早了4小时, 于是, 常规的冬眠模式就与进食时间不大相关了。小鼠在进食后, 进入冬眠状态的时间越拉越长, 甚至在偶然碰到进食时间时, 也不会发生节能式降温。接着, 研究小组又推迟了进食时间, 改为每28小时给予

小鼠一次食物, 结果, 它们的冬眠行为与其进食再次失去同步性。然而, 当研究小组将失去生物钟的小鼠进食时间改为每20小时一次时, 它们又能恢复进食后4小时内降温的模式。对此, van der Vinne表示, 这表明, 在生物钟缺失的情况下, 小鼠的冬眠可被进食时间控制。

简而言之, 冬眠由小鼠体内的生物钟激发, 但刚吃完东西的小鼠则无需保存能量, 所以当偶然碰到一次进食的时候, 会跳过体温下降的行为。然而, 食物能够决定失去生物钟的小鼠进入冬眠的时间。Van der Vinne表示, 总的来说, 他们的研究数据表明, 小鼠每天的冬眠行为是应对能量缺失挑战的投机策略, 它出现的条件是合适的进食时间, 而这个时间的调节则与内在的生物钟紧密相关。

原文检索:

van der Vinne, V., Bingaman, M. J., Weaver, D. R. and Swoap, S. J. (2018). Clocks and meals keep mice from being cool. *J. Exp. Biol.* 221, doi:10.1242/jeb.179812.

文佳/编译



合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmicS.com