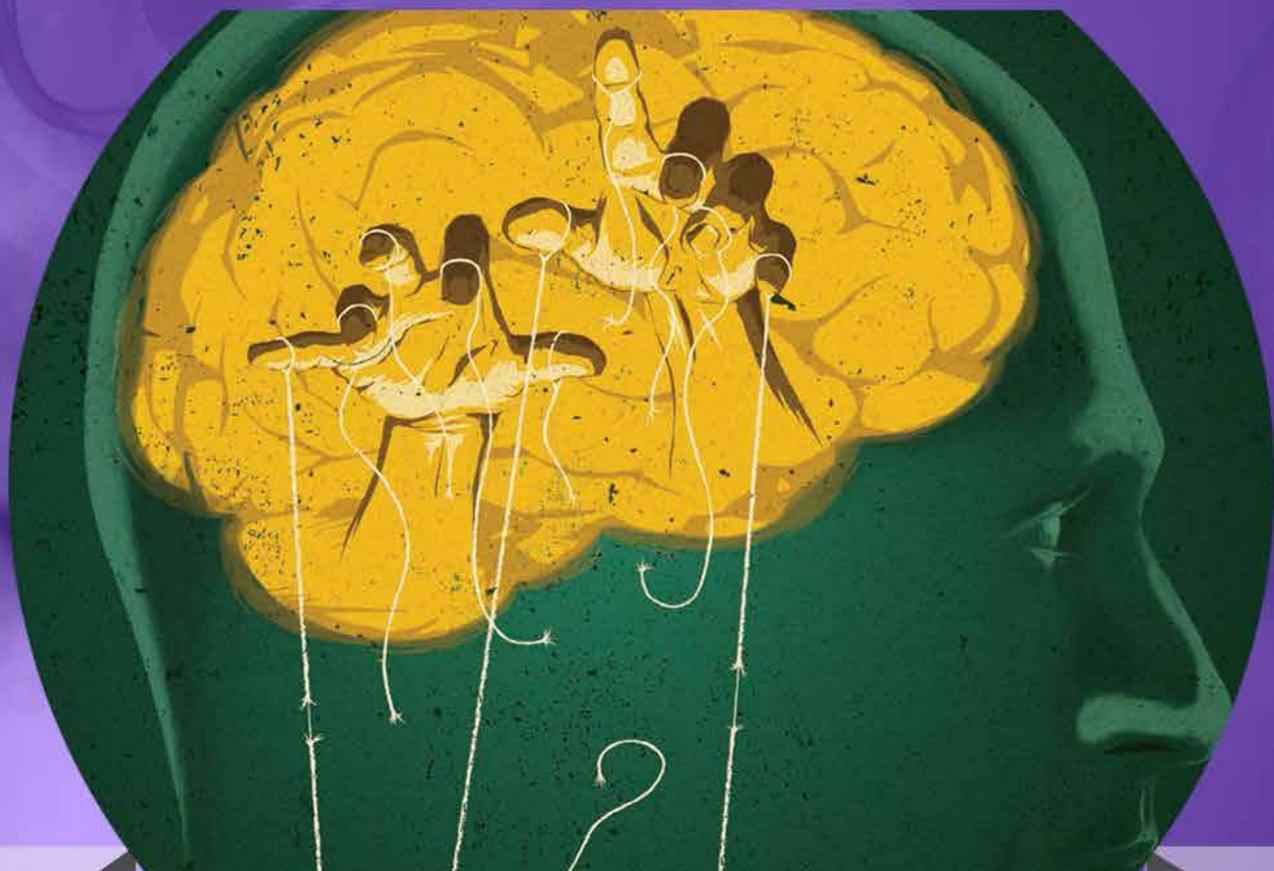


生命奥秘

Lifeomics

2018年7月刊 总第107期



肌萎缩侧索硬化症

如何避免PCR技术在微生物学研究中的偏倚
蟒蛇的补脑神技

无奇不有
生命世界
解读生命
走进科学

目录 : CONTENTS

专题 — 肌萎缩侧索硬化症

前言	01
一、ALS的遗传学研究：C9ORF72基因突变的发现	02
二、非家族性的ALS：错综复杂的ALS	08
三、机器学习：“计算”ALS	14
四、临床试验：ALS相关试验概述	21
五、药物治疗：ALS最新治疗技术进展	25
六、为ALS筹集资金：冰桶挑战大获成功	30
七、观点	35
1. 我们不应将关注点局限在家族史上	35
2. 解密ALS的《X档案》	37

下一期（2018年9月刊）预告：多发性硬化症

下一期《生命奥秘》将以《多发性硬化症》为专题。多发性硬化症（multiple sclerosis, MS）简直是一种毁灭性的疾病，它诱导机体自身的免疫系统侵蚀神经中枢系统，慢慢地破坏患者的身体活动能力。尽管研究人员已经对多发性硬化症研究了好多年了，但是仍然对它了解得不多，相关疾病机制还有待阐明，而且针对这种疾病的治疗方法也少之又少。不过，最近致力于确认病因，并开发创新性疗法的新研究意味着，虽然该病的研究进程仍然很缓慢，但总算开始提速了。

热点

如何避免PCR技术在微生物学研究中的偏倚	40
----------------------------	----

百态

蟒蛇的补脑神技	50
面相各异的鱼儿吸食方式相同	53

专题

肌萎缩侧索硬化症

前言

肌萎缩侧索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis, ALS）是一种毁灭性的疾病，人们至今对其病因知之甚少，无法找到有效的治疗方法。但是，尽管如此，研究人员的不断努力让患者逐渐看到了希望。本专题主要介绍疾病遗传研究和流行病学研究揭开ALS神秘面纱的过程、即将面世的新药和其它疗法，以及从可为疾病提供资金资助的ALS冰桶挑战活动中获得的经验和教训。

一、ALS的遗传学研究： *C9ORF72*基因突变的发现

多年来，研究人员一直忽略了ALS最常见的遗传原因。现在他们正在努力攻克这一难题。

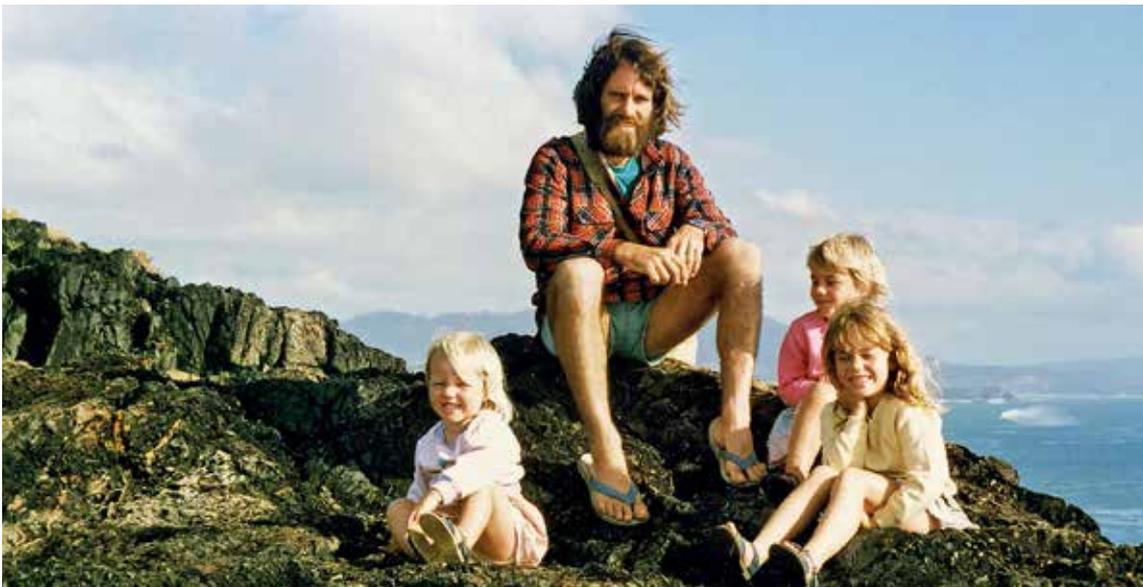
Mark Price家族的神经系统疾病病史较长。他的姐姐和叔叔死于ALS，而他的母亲和阿姨则患有痴呆症。但直到2010年，在他的女儿Sharon婚礼后不久，Price自我嘲讽时，才突然想到——造成其家族悲惨医学史的元凶可能是基因缺陷。

不到一年，Price就被确诊ALS。Sharon想知道她或她未来的孩子是否也会罹患神经系统疾病，于是她决定放下手上一切事情，在搞清楚这个问题之前，暂时不生孩子。当时Sharon 26岁。起初，Price的医生发现，他没有携带任何当时已知的、与ALS相关的基因缺陷。随后在2011年9月的报告中，两个科学家小组发现了一个新的与ALS相关的基因，它可以解释40%的家族病例和10%的散发病例。更重要的是，该基因缺陷是30%的额颞叶痴呆

（frontotemporal dementia, FTD）的病因，这就解释了为何有ALS家族病史的人——就像Price——很容易罹患神经退行性疾病。

这个基因就是*C9ORF72*。它的核苷酸序列模式与众不同。在一些ALS或FTD患者中，*C9ORF72*非编码部分的一小段DNA——GGGGCC——的重复次数达到数百次甚至数千次；而在健康个体中，该部分的重复次数不超过20次。

2012年初，Price接受了*C9ORF72*重复序列片段检测，结果呈阳性。不到一年，Price就去世了。Sharon和她的两个姐妹在为父亲的去世而悲伤的同时，不得不面对这样一个不幸的事实：她们每个人都有50%的概率携带了该基因缺陷。现在，她们必须决定是否要接受*C9ORF72*重复序列片段的检测。



1988年，Mark Price和他的女儿们一起拍了一张合照。2011年，Price被诊断患有ALS，他携带的是*C9ORF72*基因突变。

寻找致病基因

*C9ORF72*的故事始于德国精神病学家Anton von Braumühl。1932年，他首次在ALS和FTD之间建立了联系。但直到20世纪中期，科学家们开始注意到，很多家族这两种疾病的发病率都很高，才开始重点研究9号染色体的短臂，以寻找致病基因。2010年，研究人员将搜索范围缩小到了23.2万个核苷酸——以基因组的大小来算，这只是很小的一个范围。但是该区域的四个基因都不含任何能够解释这两种疾病关联的、可引起蛋白突变的基因突变。

伦敦国王学院（King's College London）的神经学家兼临床遗传学家Ammar Al-Chalabi指出，这就像我们知道目标地点在哪个街道，但是不知道确切的门牌号一样。

学界就这个致病基因的发现展开了研究竞赛。现在至少有五个欧洲和北美的研究小组致力于解决这个问题。许多人认为，这非常容易。但加拿大多伦多大学（University of Toronto）的分子遗传学家Ekaterina Rogueva表示，*C9ORF72*被证明是“非常狡猾的”，“要在这个区域（9号染色体的短臂区）进行相关研究并不容易。”

梅奥诊所（Mayo Clinic）的神经遗传学家Rosa Rademakers领导的一个研究小组专注于一个三代家庭，其中10个人有ALS、FTD，或两者兼有。Rademakers表示，因为不知道到底哪个是致病基因，所以他们不会放过每一个可疑的基因，其中就包括了富含GGGGCC片段的*C9ORF72*基因。

Rademakers等人使用聚合酶链式反应（polymerase chain reactions, PCR）来扩增该区域，并看到了一种不同寻常的遗传模式：对有神经退行性疾病家族病史的每位家庭成员

的PCR检测显示，ALS和FTD病人携带两个相同的*C9ORF72*基因拷贝，然而这两种病人的*C9ORF72*基因应该具有不同的突变。

对Rademakers来说，这真是一个令人头疼的问题。后来某天，她灵光一闪，想到这两种疾病遗传缺陷的尺度可能大于PCR可以读取的上限。她和她的合作者转而采用了一种更为敏感的技术——重复引物PCR技术（repeat-primed PCR），并观察到大量的重复扩增——只有患上这两种疾病的家庭成员才有这个情况。家族里幸免于这两种疾病的成员都不携带大量的重复扩增。1000名左右的健康对照者也没有。

此外，研究人员还对另外696名患有ALS或FTD的患者进行了测试，以确保这一现象不是他们所研究的家族特有的。果然，他们在另外59个无关个体中发现了*C9ORF72*突变，其中22个没有已知的神经退行性疾病家族史。进一步的实验表明，GGGGCC片段在这些患者体内的重复次数超过700次。

据Rademakers回忆，这个发现对临床意义重大。与此同时，马里兰州贝塞斯达美国国家老年研究所（US National Institute on Aging）的神经学家、遗传学家Bryan Traynor领导的一个国际团队也有同样的发现。Traynor使用第二代测序技术发现了*C9ORF72*基因中的重复序列。看到这个结果时，Traynor特别激动！

这两个团队于2011年9月在《神经》（*Neuron*）杂志上分别发表了他们的成果，并击败了其他还在继续寻找致病基因的团队。Alchalabi指出，虽然被打败了，但从某种意义上说，即便输了也还是很高兴。



体外受精使Price的女儿Sharon Stone（左）和Jodie Price可以生育健康的后代。

令人兴奋的时刻

这一发现产生了直接的影响。英国谢菲尔德大学（University of Sheffield）的神经病学家Pamela Shaw指出，患者*C9ORF72*缺陷的发生频率非常高，以致于“所有对ALS感兴趣的人都感觉自己应该研究该基因”。

英国北安普敦运动神经元疾病协会（Motor Neurone Disease Association）研究发展部主任Brian Dickie回忆起自己从伦敦飞往美国参加9月的会议的情形。当时是Rademakers和Traynor的论文发表五天后。几名ALS研究人员和临床医生也在飞机上，有人把这两篇论文打印了很多份。Dickie表示，当他们下飞机时，他们在给大家分发这两篇论文。这显然是一个激动人心的时刻。

几个制药公司觉察到了其中蕴含的巨大商机。纽约Regeneron Pharmaceuticals公司的功能基因组学负责人Brian Zambrowicz指出，制药行业很难忽略像*C9ORF72*这样的发现。Regeneron Pharmaceuticals最初以攻克

神经退行性疾病为企业目标，但是20年前当公司的第一个ALS候选药物失败后，该公司便扩大了战略方向。根据Zambrowicz的说法，*C9ORF72*的发现促使公司重新关注ALS疗法，并从创建*C9ORF72*小鼠模型开始。

无独有偶，专注于反义RNA疗法（关闭致病基因的表达）的Ionis制药公司也迅速采取了行动。据总部位于加州卡尔斯巴德的Ionis制药公司高级研发副总裁Frank Bennett回忆，文章发表的那一天，他们就制定了计划。在两年内，Bennett和他的学术合作者证明了反义药物可以减少细胞培养物中异常的*C9ORF72* mRNA水平。两年后，他们在小鼠模型上得到了概念验证数据。来自Ionis的主要候选药物目前正在进行临床前毒理学研究，明年年初便可开展人体试验。

华盛顿ALS协会首席科学家Lucie Bruijn指出，能有这样的速度部分原因是由于研究人员大量涌入这一领域，推动了*C9ORF72*缺陷

的致病机制研究。重复片段也发生于其它神经退行性疾病，包括亨廷顿病、强直性肌营养不良和脊髓小脑性共济失调中。此外，FTD患者也有这种基因缺陷。虽然研究这些脑部疾病的研究人员历来各自为战，但自从C9ORF72被发现以来，他们怀着相同的目标走到了一起。

Bruijn表示，突然间，大量临床医生和科学家都开始对ALS感兴趣。这给该领域带来了巨大的推动力。为什么GGGGCC突变可能导致罹患ALS或FTD，首要关注的是正常的C9ORF72蛋白，而非重复片段。Rademakers注意到基因缺陷患者正常的C9ORF72蛋白水平有所降低。虽然该蛋白质的作用仍不清晰，但它被认为与细胞内的分子运输有关。Rademakers观察得出的结论是，低水平的正

常C9ORF72可能会驱动病理性大脑反应。

最初的研究结果似乎驳斥了这个假设。神经元中几乎不表达C9ORF72蛋白的小鼠并没有表现出神经退行性疾病行为，它们的大脑中也不存在ALS或FTD的分子特征。然而最近有几个研究小组已经注意到，在所有组织中都缺乏C9ORF72的小鼠存在免疫缺陷。总之，这些发现表明，尽管免疫应答的变化可能会增加疾病的严重程度或使其继续恶化，但正常的C9ORF72蛋白的低水平本身并不引起神经元降解。荷兰乌得勒支大学医学中心（University Medical Center Utrecht）的神经科学家Jeroen Pasterkamp指出，虽然这可能还是会产生一定影响，但需要与其它机制联合起来，才能发挥效应。

毒性蛋白

最明显的替代机制是RNA毒性。非编码核苷酸重复序列异常扩增引起其它疾病的机制是：细胞核中异常RNA大量聚集，与维持细胞正常功能所需的持家蛋白结合，并阻碍其发挥功能。为了验证这一假设，伦敦大学学院（University College London）的分子神经科学家Adrian Isaacs等人构建了转基因果蝇，以测试这些异常RNA聚集体是否会引发疾病。结果令他们非常惊讶。

拥有超过100个GGGGCC重复片段的果蝇确实表现出C9ORF72介导的神经退行性疾病的迹象——但只有当含有重复序列的RNA被翻译成蛋白质，而不是阻断其它蛋白合成时才会出现这种现象。换句话说，RNA聚合物不足以引起疾病。流氓蛋白似乎是真正的元凶。Isaacs表示，他以为果蝇会告诉他们这是一种RNA毒性导致的疾病，但是当看到数据时，得出的结论是情况并非如此。

通过GGGGCC重复片段合成的蛋白质是通过一个不寻常的过程合成的：不需要起始信号，即使重复序列位于非编码基因区域也能合成蛋白。2010年，佛罗里达大学医学院（University of Florida College of Medicine）的神经遗传学家Laura Ranum首次报道了在脊髓小脑性共济失调和肌强直性营养不良患者的组织样本和小鼠模型中存在这种现象。

根据Ranum的说法，研究界最初在很大程度上忽视了她的发现。当时许多人怀疑这个机制的真实性。然而，2011年9月，在弗吉尼亚州阿灵顿召开的RNA结合蛋白神经系统疾病（RNA-binding Proteins in Neurological Disease symposium）座谈会上，当Rademakers和Traynor向大家介绍了关于C9ORF72的发现，以及Ranum谈到C9ORF72翻译方式的特殊之处时，科学家们迅速将这些线索串联了起来。

据慕尼黑德国神经退行性疾病中心（German Center for Neurodegenerative Diseases）的分子神经科学家Dieter Edbauer回忆，当坐在观众席上听Ranum演讲时，他还拿出笔记本电脑查了查*C9ORF72*扩展序列可能会合成什么样的蛋白质。由于重复长度为6个核苷酸，而蛋白质合成中3个密码子对应一个氨基酸，因此Edbauer意识到*C9ORF72*可能会产生几种不同的蛋白质——每种蛋白都是两个氨基酸的不断重复。他列出了每种可能的二肽重复蛋白。当时，Edbauer左右观察了一下，想看看大家有没有意识到这个问题。结果显然没有。

15个月后，也就是2013年2月，Edbauer等人发表论文指出，这些蛋白质会在

*C9ORF72*感染者的大脑中累积。几天之内，分子神经科学家Leonard Petrucelli带领包括Rademakers在内的梅奥研究所团队发表了类似的发现，Ranum自己在年底之前也发表了同样的结论。

田纳西州孟菲斯圣犹达儿童研究医院（St Jude Children's Research Hospital）的分子遗传学家Paul Taylor指出，后来有证据表明，至少有一些重复的蛋白质是“毒性一致的”。这些蛋白质似乎通过影响脑细胞核和胞质之间的分子运输来引起神经变性。约翰霍普金斯大学医学院（Johns Hopkins University School of Medicine）的神经病学家Jeffrey Rothstein指出，*C9ORF72*突变的核心实际上就是核运输。

影响临床

一些研究人员现在已经相信，*C9ORF72*可通过毒性蛋白导致神经退行性疾病的发生。德克萨斯大学西南医学中心（University of Texas Southwestern Medical Center）的生物化学家Steven McKnight表示，他敢断定就是这些有毒的二肽多聚物导致了疾病的发生。McKnight认为RNA聚集体以及*C9ORF72*蛋白质水平偏低都是次要的。

但是大多数研究人员并没有这么肯定。斯坦福大学医学院（Stanford University School of Medicine）的分子神经科学家Aaron Gitler指出，他们有充足的证据显示，在这些简单模型里，毒性蛋白是致病因子。不过，他同时强调，在人类疾病背景下，疾病可能由多因素混合引起。因此，我们必须保持开放的心态。

关于疾病机制的争论不纯粹是学术的，它也指导着药物的开发。一些公司，包括苏黎世的Neurimmune和麻省剑桥的Voyager

Therapeutics均专注于阻止重复蛋白的功能，或阻止它们的合成；而另一些公司，如麻省牛顿市的Karyopharm则希望通过靶向核运输缺陷，而不直接靶向任何*C9ORF72*基因产物来治疗疾病。

但是一些治疗策略，如反义RNA的效果并不取决于实际的机制。麻省Wave生命科学公司的首席执行官Paul Bolino表示，由于反义药物可以关闭RNA和蛋白质的合成，因此不管是毒性蛋白致病，还是RNA致病，反义RNA都是有效的。该公司计划于明年展开靶向*C9ORF72*反义药物治疗的人体试验。由于科学家可以追踪脊髓液中毒性蛋白的水平，因此可以直接评估药物是否有效。Bolino指出，ALS和FTD里确实有一个可衡量的生物标志物。

短短几年里，研究者和制药公司在ALS的研究上取得了重大进展。很可能在Mark Price

的亲人开始出现更多的神经性病变之前，有效的C9ORF72突变相关疾病的疗法就已经问世了。他最小的女儿Haley认为前景还是很乐观的，但她担心政策制定者没有充分推动C9ORF72相关疾病的预防性健康措施，毕竟这样可以避免与C9ORF72相关的疾病的发生。

为了后代健康着想，Haley和她的姐妹们在父亲测试结果显示阳性之后不久就接受了C9ORF72测试。不幸的是，她们三个都携带了缺陷基因。每个姐妹都经历了多轮的体外受

精，还有一个额外的步骤，即在植入前检查胚胎是否携带了C9ORF72缺陷。她们认为，这对个人生理、心理还有经济上都是非常沉重的负担。整个受精及胚胎检测过程所需费用高达15万澳元（12万美元）。但不管怎么样，Haley指出，这是科学的伟大成功，她们终于可以摆脱家庭的诅咒了。

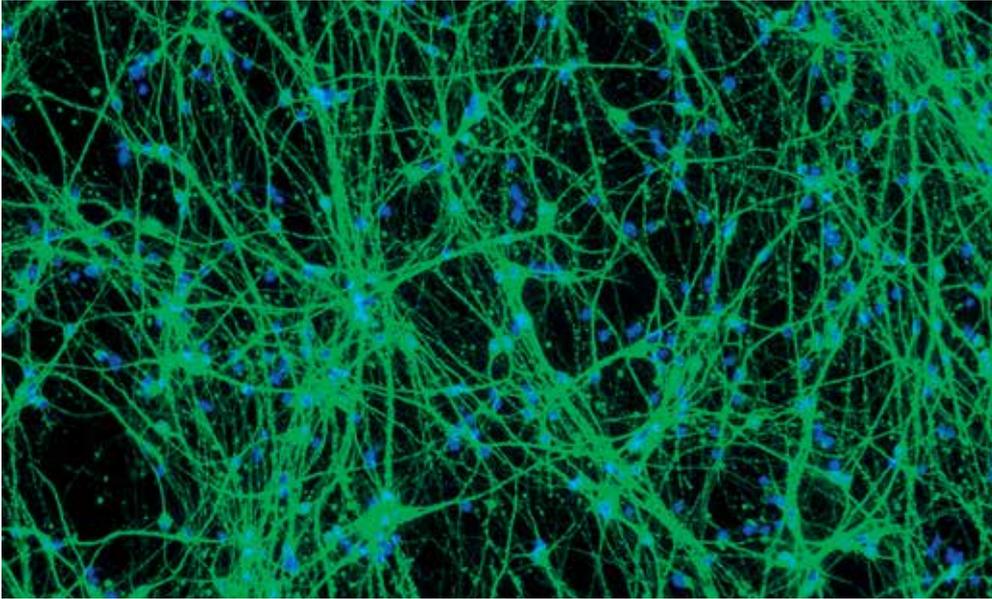
Sharon的儿子Jack最近刚刚庆祝了三岁生日，11月中旬Jodie将迎来女儿的出生，而Sharon还冷冻了两个胚胎，准备在12月9日的婚礼后使用。

资讯 · 频道

www.LifeOmics.com



二、非家族性的ALS: 错综复杂的ALS



通过从细胞层面至整个患者群体层面的不同研究，人们已经逐渐发现了非家族性ALS的致病机制，环境因素的作用也慢慢地显露出来了。

有一天，Ed Tessaro在跑步时感觉他的左脚踝不舒服，这也是他最早发现的身体不适症状，之后不久他的整个右腿都变得疲软无力了。医生根据病情，将其诊断为脊椎椎管狭窄（spinal stenosis），可结果却发现误诊了，于是Tessaro找到了神经科专科医生，并且在2009年被确诊为ALS，那一年他62岁。Tessaro从一家零售公司退休后，和他的妻子居住在美国亚特兰大市。患病之后，Tessaro只能使用轮椅和其它的辅助设备才能活动，可就算是这样，他还是游遍了七大洲。Tessaro表示，他总有办法做他喜欢做的事情。

ALS是一种累及大脑和脊髓运动神经元细胞的神经退行性病变，患者的临床表现多种多样。虽然大部分ALS患者都是在六十多

岁发病的（发病高峰就在60至69岁之间），但也有一些患者会在年纪更大，或者比较年轻时发病，比如著名的英国物理学家Stephen Hawking就是在二十多岁时被确诊的。ALS发病时往往会累及患者的胳膊或者大腿，不过也有1/3的患者初发症状表现为咀嚼、说话，或者吞咽困难。有些患者还会发展为额颞叶痴呆（frontotemporal dementia, FTD）（也是一种神经退行性病变）。

ALS患者几乎都会在发病3到5年内因为呼吸肌衰竭死亡。可是Tessaro发病之后却存活了9年。他对此也感到奇怪。而像Hawking那种非常年轻时就发病的ALS患者，存活时间一般也都比较长。

大部分ALS患者都和Tessaro一样，没有

家族史。实际上，ALS患者家属中只有约10%的家属也会受累。英国伦敦国王学院（King's College London）运动神经元疾病医疗研究中心（King's MND Care and Research Centre）的主任Ammar AlChalabi认为，这个数字可能有点保守，因为他认为，之前肯定有很多患者都被误诊了，而且大家也没将FTD和ALS联系在一起，所以很多ALS患者的家属其实也都可能是ALS患者，只是他们自己不知道而已。目前，大多数ALS患者的病因都不甚清楚。

所以，ALS不仅是最致命的一种疾病，也是最神秘的一种疾病。美国亚特兰大市美国国家肌萎缩侧索硬化症注册中心（National ALS Registry in Atlanta, Georgia）是一个美国的病例数据库，它存储了大量的ALS患者血样和组织样品。据该中心的首席科学家Paul Mehta介绍，关于ALS，我们还有太多的未解之谜，并且目前还很难找到答案。

不过这一切，有望很快得到改变。Al-Chalabi表示，他们正在以前所未有的速度拓展对ALS的认识。人们过去对这种疾病的‘误解’正在一一被纠正，他们已经有了一个彻底的、全新的认识。这种改变也给我们认识这种疾病的病因和病理机制提供了新的机会。

科研人员正在更深入地了解ALS患者运动神经元细胞里发生了哪些改变，比如出现了哪些错误折叠的蛋白质，这一点与克-雅

氏病（Creutzfeldt-Jakob disease）或疯牛病（bovine spongiform encephalopathy）比较类似。早在1982年，Stanley Prusiner就证实，这些名为朊病毒（prions）的错误折叠的蛋白质可以和传染性病毒（infectious agents）一样，在体内播散，让其它正常的蛋白质被“感染”，形成错误折叠。

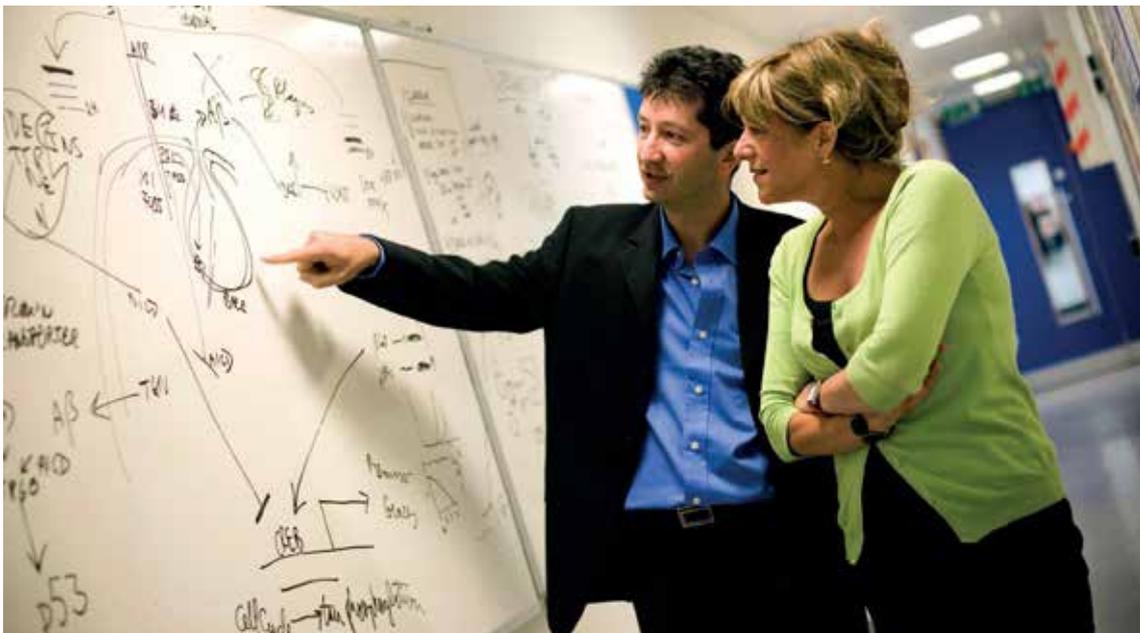
有一些科研人员对ALS的生理学有比较深入的研究，而另外一些科研人员则对与ALS相关的基因更加了解。他们发现有一些基因的数量，在这类患者体内明显增多，而且这种现象与患者是否存在家族史无关。自从诱导多潜能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPSC）和诱导神经元细胞（induced neuronal cell, iNC）技术出现之后，科研人员们更是可以方便地在体外开展实验，以对这种罕见的疾病开展研究。大数据分析技术的出现，更是方便了对全国、乃至全世界范围内的患者数据进行分析，这也让科研人员们第一次有机会对这种罕见疾病进行流行病学调查（epidemiological research），而且还有机会从中发现可能存在的环境致病因素。据Al-Chalabi介绍，直到最近这一两年，他们才开始有机会认识环境因素对ALS的作用，因为他们直到最近才有机会获得这方面的、有价值的的数据。只有将遗传学、细胞生物学，以及流行病学等各方面的信息整合到一起，才有可能揭开ALS的神秘面纱。

多致病因素、多病理结果

科研人员们渐渐发现，ALS比我们预想的要复杂得多。不仅仅是因为该疾病涉及我们身体的多个部位，会产生多种不同的病理结果（比如肢体运动障碍、语言和吞咽障碍，还包括认知功能障碍），还因为这种疾病可能存在多种致病因素。科研人员不断发现新的、与这种疾病有关的遗传突变和环境风险因子。虽然人们在所有ALS患者的运动神经元细胞里都发现了异常折叠的蛋白质，但是这些研究的结果不太一致。Al-Chalabi认为，我们就好像面对的是一张网，横过来看，存在很多种致病因素；而竖起来看，又存在多种病理表现。找到这张网的关键节点，能够做到纲举目张，是我们每一位从事ALS研究的科研人员的终极目标。因为只有这样，才有可能找到防治这种疾

病最有效的方法。

自1990年起，科研人员就已经找到了与ALS有关的120种不同突变，这些突变一共涉及25个基因。据Al-Chalabi介绍，研究人员差不多每4年就能发现一个新的相关基因。这些突变有很大一部分都与是否存在家族史无关。这也说明，这些突变不是遗传性的，而可能是因为随着患者的年龄增加、或者因为暴露在某些环境损伤因素之下而导致的后天性的DNA损伤。一些遗传突变与患者的发病年龄（即肌肉或者神经初次受累时），或者病程长短有着明显的关联。但是基因并不能预测患者的临床预后。哪怕是一个家系里的不同患者，他们的自然病程也不尽相同。



Ammar Al-Chalabi和他的同事Isabella Fogh正在讨论神经变性信号通路。

科研人员通过细胞学研究，发现ALS通过非常复杂的信号通路在影响患者的运动神经元细胞，这让科研人员感到非常迷惑。近15年来，我们最大的一个发现就是在ALS患者的运动神经元里找到了异常的蛋白质斑块，其中就包括TDP-43蛋白和FUS蛋白，而这两种蛋白质在正常情况下都会参与细胞内的多种功能。当这些蛋白质彼此聚集成团之后，就会导致问题出现。研究发现，这些异常蛋白质在细胞内的定位也出现了异常。在病变细胞内，这些蛋白质转移到胞质中，而不再像正常时那样，在胞核内发挥作用。而且这些蛋白质在病变细胞里往往与泛素蛋白（ubiquitin）相结合。我们知道，这是待降解的标志。除此之外，这些异常蛋白也与朊病毒一样，会出现折叠方式异常，而且这些错误折叠的蛋白质还彼此聚集在一起，像朊病毒那样在细胞之间不断地传播、扩增，这也可能是ALS会逐渐累积更多神经元细胞的原因。这些异常的蛋白质斑块对神经元细胞是具有毒性的，进而会引发炎症反应，使细胞失去正常的功能，然后变性和退化。

还有一个因素也可能是ALS的致病因素，那就是C9ORF72基因突变。这种能表达异常的、具有神经元细胞毒性的C9ORF72蛋白，会使神经元细胞发生自噬（autophagy）。另

外，运动神经元细胞的轴突也会出现异常。我们知道，轴突结构的完整性主要依赖于微管蛋白（microtubules）组成的细胞骨架（cytoskeleton）。很多ALS患者体内的微管蛋白也会出现异常，这往往也是细胞骨架蛋白编码基因突变的结果。

据比利时VIB-KU Leuven脑科学疾病研究中心（VIB-KU Leuven Center for Brain and Disease Research in Belgium）的神经学家Ludo Van Den Bosch介绍，为了证实基因突变与疾病的关系，科研人员们常常会在动物模型中进行验证。可是在很多非家族性ALS患者体内根本找不到突变的基因，所以只能利用这些患者自身的细胞，依靠诱导干细胞技术来构建病理模型。这也是目前唯一一种构建无相关突变ALS模型的方法。Van Den Bosch表示，如果都找不到病因，那怎么可能构建出模型呢？当然，诱导干细胞技术也早就被用于有突变的ALS研究工作当中了。

诱导神经细胞技术是跳过干细胞阶段，直接利用患者的体细胞，培育出神经元细胞的一种新技术。Van Den Bosch希望利用这两种体外细胞培养技术解开ALS的谜团，帮助我们认清很多与ALS有关的信号通路究竟是导致疾病的原因，还是疾病出现之后产生的结果。

样本量的作用

此外，通过寻找患者之间的共同点也可以解答这个问题。临床医生们一直都在关注ALS患者之间的共同点。但是由于这种疾病比较罕见，所以很难通过小样本的研究来开展流行病学调查，从而明确这些共同点与疾病之间是否真的存在确定的关联。然而，如果样本量太小，就不能通过统计学分析确定遗传，或者环境因素是否为唯一的相关致病因素。小样本

研究往往都是将ALS患者与健康的正常人群进行对照研究，可是这种试验也有一些缺点，比如患者的记忆力可能已经受损，这就会在让他们在回忆“致病因素”时导致偏差的出现。一直在从事环境及职业流行病学研究的美国哈佛大学公共卫生学院（Harvard School of Public Health in Boston, Massachusetts）的Marc Weisskopf表示，由于这种原因，我们都希望

开展大规模的前瞻性研究，只有这样才有可能找到有价值的线索。

比如在北欧国家，政府为每一位国民都建立了完整的健康档案。据专门从事肿瘤及ALS研究的位于丹麦哥本哈根的丹麦肿瘤学会研究中心（Danish Cancer Society Research Center in Copenhagen）的Johnni Hansen介绍，他们那里是世界上唯一可以在整个国民范围内开展流行病学研究的地方。虽然丹麦全国只有大约600万人口，但是他们从1977年开始就完整记录了所有国民的健康数据。正因为他们有多年的数据，所以可以开展大规模的临床研究。而且丹麦自1964年之后，还为每位国民建立了工作档案，利用这些数据，我们也可以了解职业与健康的关系。

利用丹麦的这些数据，科研人员已经发现，与ALS有关的因素有很多，这些因素包括极低频的电磁场（extremely-low-frequency electromagnetic fields）、心血管疾病（cardiovascular disease）、创伤（physical trauma）、甲醛暴露（formaldehyde）和服兵役（military service）等，它们都是ALS的高危因素。自从美国发现杀虫剂和除草剂与ALS的关系之后，已经有多项研究证实了甲醛与这种疾病的关系。

其他一些国家也已经为ALS患者建立了他们的登记制度。比如欧洲国家在2004年设立的EURALS组织（EURALS consortium）就已经收集了与ALS相关的数据。这项研究涉及意大利、苏格兰、爱尔兰、塞尔维亚全国，以及英国和法国的部分地区，荷兰也正准备加入该项目。

据Mehta介绍，美国也于2010年建立了全国性的ALS登记制度，而且他们的工作不仅仅只是登记、记录ALS患者的数量。美国有毒物质及疾病登记处（Agency for Toxic

Substances and Disease Registry）作为该工作的主管部门，也负责为相关的科研和临床试验工作提供资金和患者招募支持。比如，该登记处也为赤潮（algal blooms）研究提供资助，因为有研究发现，引发赤潮的蓝藻（cyanobacteria），以及由蓝藻产生的神经毒素都会增加ALS的患病风险。自2016年开始，该组织也开始收集ALS患者（包括在世的和离世的）的血样和组织样品。

人群研究表明，服兵役也是ALS的高危风险因素，军人患上ALS的几率更高，而且哪怕是没有进入过战区的军人也是如此。Tessaro本人也曾在越战时期在美国空军服役，但是他也没有参加过战斗。1991年海湾战争之后，美国ALS的发病率增加了一倍。那么这背后究竟有什么样的关联呢？Weisskopf指出，对此，他们也不太清楚，还需要更多的数据来了解这些军人都经历了什么。他们也需要明确其它研究发现的高危因素是否真的就是高危因素，比如强体力活动、身体创伤和铅暴露等。

强体力活动和身体创伤也可能与美国职业足球运动员里较高的ALS发病率有关，他们的发病率是普通人群的四倍。但是这也不一定。有一些科研人员指出，因头部反复多次受到撞击而引起的慢性创伤性脑部病变（chronic traumatic encephalopathy, CTE）在过去也曾经被认为是ALS的表现，但现在已经澄清了这一点。作为某一涉及足球运动员的研究项目的顾问，Weisskopf也承认，强体力活动和身体创伤与ALS的关系还不是十分的清楚。我们有可能将慢性创伤性脑部病变误诊为ALS；当然慢性创伤性脑部病变也可能导致ALS；或者身体创伤既可能引发慢性创伤性脑部病变，也可能引发ALS。Al-Chalabi认为，错误折叠的蛋白质是问题的关键，因为美国职业足球运动员的大脑损伤之后，也会出现错误折叠的蛋白。

未来的发展

未来，探讨ALS致病因素的研究工作应该是将流行病学、遗传学和细胞生物学等多个学科综合起来。

Weisskopf指出，我们需要在实验室里用动物模型来验证流行病学的研究成果，从细胞层面去验证这些发现，同时判断在生物学层面是否也是正确的。利用患者自身的组织、诱导多潜能干细胞和诱导神经细胞也可以重建整个细胞病理过程。

蛋白质错误折叠也许是将非家族性ALS的发病机制和病理表现联系起来的关键。ALS可能是环境因素和突变共同作用的结果，这些环境因素可能会影响维持细胞蛋白质完好性的相关细胞机能。Al-Chalabi认为，如果细胞机能

受到影响，不能正常发挥作用，那么就有可能导致蛋白质形成错误的折叠。Weisskopf也指出，甲醛就是这样一种影响因素。

而开展这些研究工作的关键就是储存在各个登记机构里的患者血样和组织样品。Mehta指出，虽然现在才开始做这些工作可能对今天的患者没有太大的帮助，但是这些工作也是非常有意义的。Tessaro也在美国登记过，他还参加了一项干细胞移植试验。他和他48岁的妻子Judy也曾经为肌肉萎缩症协会（Muscular Dystrophy Association）募集了数百万美元，以用于开展ALS研究工作。Tessaro表示，群体的力量肯定要比个人的力量更大，这就是他们参加这些组织的原因。

三、机器学习：“计算”ALS



这名患者登记参加了“揭秘ALS项目”，该实验的目的就是为了更好地区分各个ALS亚型。

利用机器学习（Machine learning）可以帮助我们更早地发现疾病，更准确地预测疾病预后，同时也可以更高效地为这些患者选择更合适的临床试验。

神经学家Peter Bede认为ALS是非常麻烦的一种疾病。ALS与其它很多疾病不同，甚至与其它很多神经系统疾病也不同，因为这种疾病很难通过体检或实验室检查来确诊。

据爱尔兰都柏林圣三一学院（Trinity College Dublin）的ALS研究人员Bede介绍，如果他怀疑某人得了多发性硬化症（multiple sclerosis），那么他就会让患者去做一个MRI检查，同时做一个腰椎穿刺检查（lumbar puncture），这两个检查足以确诊。可如果Bede怀疑他患了ALS，就不知道该做哪些检

查以确诊了。他只能给患者做一个身体检查，然后让患者一个月之后再复诊，看看病情有没有变化。如果在7、8个月内，患者的病情持续恶化，那么他们才可以明确地告诉患者，他患上了ALS。在诊断ALS时，不能依靠血液检查或X线检查这些实验室检查手段，只能依靠病情的演变来判断。作为一名医生，Bede感到非常的无助。虽然他怀疑患者患上了这种疾病，但却必须等几个月之后才能百分之百肯定地告诉患者是否真的患上了这种疾病。患者本人更加懊恼，因为这些患者从发病至确

诊，平均耗时一年。在这一年里，他们无法获得处方，不能服用可以延缓ALS病情进展的药物（目前只有两款药物），却不得不多次接受不必要的手术，因为他们往往会被误诊为椎间盘压缩（**compressed disc**）或者腕管综合症（**carpal tunnel syndrome**）等其它疾病。这一年的耽误还会让相关的临床试验工作受阻，延缓相应的药物研发工作。

ALS除了让医患双方束手无策之外，还是让科研人员们头痛的一种疾病，因为它的病程很难被预测。幸运的是，虽然很多患者往往在短期内就不幸去世，但是也有很多患者可以继续生活几十年。不过现在机器学习技术可以为科研人员提供更多新的线索和视角来研究这种疾病了。科研人员们希望利用模式识别软

件（**pattern-recognition algorithms**）来分析患者的大脑及脊髓MRI扫描图像，以期更早明确诊断。科研人员们还希望将基因测序数据与临床发现结合起来，借此判断患者的病情进展情况，并将他们的病情进展分为慢、中和快三大类，以便更好地匹配临床试验项目。科研人员们还试图通过声音分析技术（**acoustic analysis**）对患者的语言进行分析，来达到早期诊断的目的；他们也使用天然语言处理系统（**natural-language processing**）来搜寻神经系统退化的征兆。当然也少不了电子病历档案的帮助，看看是否能够从中发现几年前的蛛丝马迹，从而帮助诊断ALS。临床医生和科研人员希望利用这些先进的技术，开发一套ALS早期诊断系统。

大量机器学习“脑活检”

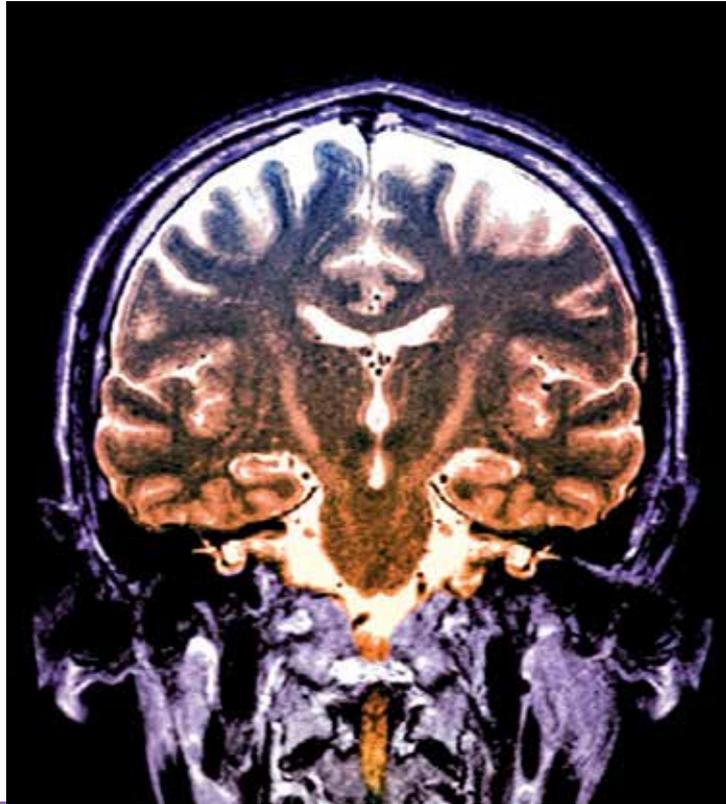
Bede正在开发一个患者大脑虚拟活检软件。他用110次MRI检查对一系列相关软件进行了检测。在这110次MRI检查中，有55次是健康对照者的脑扫描检查，另外55次是ALS患者的。这些软件可以对MRI图像进行三维重建，然后进行各种统计学分析，对各种大脑数据进行比对，其中就包括大脑白质的厚度、基底神经节的大小等参数，进而找出健康人与ALS患者之间的差异。然后，Bede再用MRI检查对这套系统进行验证。结果在40多次验证试验中，软件正确识别ALS患者的比例达到了90%。

Bede还对计算机进行了另外一种训练，即联合使用MRI图像和临床数据，让计算机来预测ALS患者的预后。这些临床数据包括发病年龄、身体最先出现异常的部位、以及ALS功能评分里的机体失能分数等。单靠这些临床数据，预测ALS患者18个月存活情况的准确

率为67%；单用MRI数据，准确率可以提升到77%。如果将两者结合，准确率则可以提升到79%，同时还能降低假阴性率。

虽然试验结果不错，但是Bede还是希望用更大规模的数据进行验证。他开发的计算机系统能够很好地区分健康的人和ALS患者，他还希望计算机系统能够进一步区分ALS患者和其他类似的神经疾病，比如额颞叶痴呆症（**frontotemporal dementia**）患者等。

为了获得更多数据，英国牛津大学（**University of Oxford, UK**）的神经学家Martin Turner参与创建了ALS神经影像学会（**Neuroimaging Society in ALS, NiSALS**），专门收集ALS患者的MRI扫描图像。这些数据全都储存在德国耶拿（**Jena, Germany**）。迄今为止，他们已经收集了500至600名患者的大脑MRI扫描数据。



借助MRI检查，我们可以了解ALS患者的病情进展情况。

Bede更关心ALS患者大脑结构方面的变化，而Turner则不同，他更关注如何判断ALS患者的病情进展。Turner使用功能MRI技术，来研究患者的血氧水平，因为这项指标可以了解当患者从事某项活动时，他大脑里的哪一个部位是活动的。如果患者在检查时处于完全静止的状态，那么他们大脑里的各个部位都会呈现出特定的血氧曲线。神经学家们已经发现了数十种血氧曲线。

由于ALS患者等神经疾病患者之间的血氧曲线完全不同，因此，这种曲线就好像是每一种疾病的特定“指纹”。据Turner介绍，这些指纹，光看是看不出什么信息的。可是计算机能够发现其中的差异，而且还能够区分病情进展速度快的患者和进展缓慢的患者。这就是一个非常客观的生物标志物了，只需要一台电脑

就够了。

科研人员们已经注意到，有一些蛋白质在ALS患者的血液和脑脊液里的含量是与其他非ALS患者不同的。Turner认为，他们可以对这些蛋白质指标进行一段时间的跟踪，了解其变化情况，然后再结合功能MRI图像等信息，更好地对ALS患者进行分类。

判断ALS病情进展得有多快，这对于临床试验的设计工作非常重要。如果试验药物有可能延缓ALS病情的进展，但是参与临床试验的志愿者们却都是病情进展非常缓慢的那一类ALS患者，那么就很难得到有价值的临床试验结果。目前通用的ALS药物临床试验方案都是给一半志愿者服用试验药物，另外一半服用安慰剂（placebo），然后观察18个月，对比两组患者的存活率。Turner认为，这是一种非常

粗浅的试验方法，同时还会耗费大量的时间。我们真正需要的是可以对一系列生物标志物（比如影像学数据或神经化学数据等）进行检测，半年后再检测一次，仅靠这两次的数据就足以清晰地了解病情的变化情况了。

另外一种对患者进行区分的途径就是利用计算机深度学习（deep learning）技术，也就是和Google的（猫）图片识别技术类似的一种技术。深度学习技术利用的是人工神经网络（artificial neural network），其中每一个硅处理单元（silicon processing units）就构成一个人工神经元（artificial neurons），这些人工神经元彼此联系起来，就构成了复杂的人工神经网络。当数据被导入第一层人工神经元后，每一个人工神经元都会进行微小的运算，然后将结果发送给其它人工神经元，进行进一步运算，然后再将结果发送出去。如此往复，直至形成一个复杂的输入输出过程，得出运算

结果。比如，人工神经网络挑选出MRI图像里的50或60种结构特征，对ALS患者进行分析。如果要将ALS患者分为存活期较长、中等和较短这三种不同的类型，那么还可以将结构特征再扩大二至三倍。据荷兰乌得勒支大学医学中心（University Medical Center Utrecht in the Netherlands）的计算机专家Martijn van den Heuvel介绍，在底层人工神经元界面，存在数百个人工神经元间的相互作用。

如此庞大的运算量就要求我们开发出比传统机器学习技术更加高效的软件。据van den Heuvel介绍，有了深度学习技术，即便使用很少的数据，也可以得到非常不错的结果。但是深度学习需要非常强大的计算机，以目前使用的计算机为例，处理一幅MRI图片需要好几个小时，如果要预测一位患者的预后，则需要好几天。

虚拟患者

MRI扫描并不是我们预测ALS患者预后的唯一手段。通过临床试验可以收集大量的数据，计算机专家们也正在利用这些数据，开发新的预后预测工具。比如位于美国弗吉尼亚州维也纳的生物科技初创公司Origent数据科技公司（Origent Data Sciences），就正在利用临床数据开发三款计算机模型。第一款模型使用的就是ALS功能评分数据，以此来判断ALS患者可能属于哪一类情况。第二款模型使用的是肺活量数据（vital capacity）。第三款模型评价的就是ALS患者的实际存活时间。该公司利用这些工具，将真实患者的资料与模型资料进行对比，从而预测出真实患者的预后情况。

Origent数据科技公司的首席科学官Dave

Ennist表示，他们希望将这套模型整合到ALS诊断系统里，预测患者的预后，也可以将这套模型应用于临床试验，用作虚拟的对照。这样一来，临床试验里的对照组就不再是服用安慰剂的患者人群了，而变成了“不服药”的计算机模型虚拟患者。Origent数据科技公司从美国华盛顿特区的ALS协会（ALS Association in Washington DC）那获得了50万美元的科研经费。他们将利用正在进行中的tiraseptiv药物（该药物是由美国加利福尼亚州南旧金山的生物科技公司Cytokinetics公司开发的一款新药）的临床试验数据，来检验这套模型的效果。Origent数据科技公司希望此次验证工作能够证明他们的计算机模型可以准确地预测出

临床试验的结果。

除了根据病情进展的速度来对ALS患者进行分层之外，临床研究人员们还希望了解ALS的不同亚型情况。这些不同的亚型可能就是由不同的分子信号通路而导致的，所以也可能找出针对不同亚型的药物作用靶点，进而开发出针对不同亚型患者的药物。这也是“揭秘ALS项目（Answer ALS）”希望找到的答案。“揭秘ALS项目”计划一共搜集了全美国1000名ALS患者的数据。除了详细的临床数据之外，科研人员们还会用这些患者的血样培育诱导多潜能干细胞（induced pluripotent stem

cell），并分化出运动神经元细胞（motor neurons），进行后续的试验研究。科研人员们还会进行蛋白质组学分析、表观遗传组学分析和转录组学分析等多种组学分析。

据估计，“揭秘ALS项目”可能会为每一位入组的患者生成60亿个数据节点。据该项目的运算负责人，美国麻省理工学院（Massachusetts Institute of Technology in Cambridge）的计算生物学家Ernest Fraenkel介绍，他们利用大数据手段来开展研究工作，非常有希望发现不同的ALS亚型。接下来的问题就是，如何治疗这些疾病了。



这是为“揭秘ALS项目”开发的一个app小程序，可以用来了解受试者的精细运动控制能力。

语言表达的力量

“揭秘ALS项目”项目组正在开发一款在智能手机上使用的app软件，以此收集患者的临床数据，这就可以让患者和研究人员省去大量的见面时间。而且这款软件还有助于科研人员们实时跟踪患者的病情进展。比如，这款软件可以要求患者做一个深呼吸，然后尽可能多地数数，通过这种测试，就可以了解患者的肺活量有多大。通过跟踪观察一段时间内的肺活量指标，就可以判断患者的病情进展情况。这款app对于肌群协调性方面（muscular coordination）的指标也有检测作用，那就是要求患者用手指在手机屏幕上按照要求完成规定的动作。IBM开发的人工智能系统Watson医生进行过一项试验，即检测患者是否存在轻度认知功能障碍。患者在试验中会观看一些常见的场景，比如一个人在洗盘子，或者一个小孩子在爬树等，然后会再被要求复述这个场景的内容。Watson医生根据患者们的复述内容对他们的认知能力进行评分。IBM的评分指标里包含很多细节，比如患者在复述时使用的是简单的单词，还是复杂的单词等。他们希望Watson医生可以根据这些情况，判断患者的

认知功能。

语言表达还可以帮助我们诊断早期ALS，因为运动神经元如果发生病变，也会影响患者的唇、舌及声带的运动。美国德克萨斯大学达拉斯分校（University of Texas, Dallas）语言障碍及技术实验室（Speech Disorders and Technology Laboratory）主任，计算机专家Jun Wang就要求ALS患者及健康对照者念一大段句子，然后计算机会对录音进行分析，从中提取出了数百个声学特征指标，比如声调的变化、声带的稳定性（包括声带振动的频率和振幅）等。Wang利用机器学习技术对这些数据进行进一步分析，以区分出ALS患者和健康人群。

标准的机器学习技术识别ALS患者的准确率达到65%。后来在小样本患者群进行进一步测试发现，如果使用深度学习技术，准确率可以提升到92%。如果再加上嘴唇的运动（用智能手机的摄像头就能完成这项检测），还可以进一步提升准确率。Wang计划在2017年底推出他们的手机app，收集更多的患者数据，以让他们的系统更加准确。

在病历档案中寻找答案

如前文所述，ALS患者从症状初发，到最终确诊，至少需要一年。如果能够缩短这个时间，将给患者和临床试验工作带来极大的帮助，还可以让我们更好地认识ALS，并开发出更好的治疗药物。美国哈佛医学院（Harvard Medical School in Boston）及麻省总医院（Massachusetts General Hospital）的神经学家Nazem Atassi表示，如果能够在更早的阶段对病人进行研究，那么就可以发现更多的线索，对病因有更清楚的认识。同样，越早开展治疗，也就越有可能成功地延缓病情的进展。

Atassi在日本三菱田边制药株式会社（Mitsubishi Tanabe Pharma of Japan，该公司生产的ALS药物于2017年5月获批上市，是20年来第一个获批上市的同类新药）和美国纽约的医药分析公司——HVH患者精准分析公司（HVH Patient Precision Analytics company in New York City）的共同资助下，计划尝试提早发现ALS患者。他的计划是在包含了1.7亿多名美国人病历档案的商业保险数据库里寻找答案。在大数据研究人员开发的分析系统的帮助下，Atassi找到了1.4万名ALS患者，这些患者都在2010至2016年间被确诊，而且保存着在确诊之前至少5年的完整就诊记录。

结果发现，根据病历档案里既往的实验室检查结果和诊疗记录，很容易就可以找出ALS患者。据Atassi介绍，就确诊之前5年的病历记录来看，这些ALS患者和其他患者还是

有非常明显的区别的。比如，ALS患者更常见非特异性的神经系统症状。在确诊ALS 5年以前，“多发性硬化症”是ALS患者最多见的错误诊断，不过越邻近确诊时间，这个误诊的比例就越低。在确诊ALS 3年以前，萎靡不振（malaise）、疲惫（fatigue）和消化不良（gastrointestinal disorders）等是最常见的错误诊断，而且越邻近确诊时间，这个误诊的比例就越高。在确诊ALS 5年以前，“皮肤问题（Skin disorders）”也是ALS患者最多见的错误诊断，不过越邻近确诊时间，这个误诊的比例就越低。对于这个皮肤问题，Atassi也不太清楚背后的机制，不过他怀疑可能是因为患者将肌肉抽动误认为是皮肤瘙痒了。

如果可以进一步改进计算机软件，那么我们就可以在特定的时间发现具有特定症状的ALS患者，提醒临床医生进行相应的检查，或者对患者进行跟踪随访。

提早5年发现ALS患者，还可以让科研人员有机会研究该疾病的生理学问题，了解病情的进展情况，为开发出更好的药物提供更多的线索。即便没有那些早期“警示”信号的预警，科研人员也充分相信机器学习可以提早确诊ALS，让患者尽早就医诊治，或者更早加入临床试验。早期诊断还有助于新药的开发，改善患者的生活质量。Atassi认为，哪怕是提早3个月，也是一大进步。

四、临床试验： ALS相关试验概述



呼吸科治疗

膈肌起搏（diaphragm pacing, DP）试验提前结束

临床试验发现，膈肌电刺激疗法并不能推迟ALS患者使用气道通气辅助治疗（ventilation support）的时机，也不能延长患者的存活时间。

膈神经（phrenic nerves）是控制膈肌运动的神经。ALS患者的膈神经会持续受累，随之出现膈肌麻痹，并最终会丧失自主呼吸的能力。晚期ALS患者通常都需要借助呼吸机来维持生命。

有研究发现，使用膈肌起搏（一种人工模拟膈神经工作的电刺激疗法）可能会延缓膈

肌的衰弱。因此，FDA出于人道主义考虑，也同意采用膈肌起搏对ALS患者进行临终关怀治疗。法国巴黎Pitié Salpêtrière医疗集团（Pitié Salpêtrière Hospital Group）的Jésus Gonzalez Bermejo和集团旗下遍布法国的12个ALS中心的同仁们一起开展了一项随机对照试验，来评估膈肌起搏的作用。该试验名为RespiStimALS（go.nature.com/2xpqrbx）。他们一共招募了74名ALS患者，这些患者的膈肌运动能力都有中度的减弱，不过都还能够自主呼吸。

RespiStimALS试验于2015年7月正式启动，当时另外一项类似的英国临床试验——DiPALS试验 (go.nature.com/2hwnwge) 的结果已经公布了。DiPALS试验发现，晚期ALS患者在接受非侵入性呼吸支持疗法的同时，如果再辅以膈肌起搏，会增加患者的死亡率。在RespiStimALS试验中也发现，接受膈肌起搏的患者死亡率也更高一些，同时他们也需要更

早地接受非侵入性的呼吸机支持治疗，因此，RespiStimALS试验被提前终止了。

RespiStimALS试验和DiPALS试验表明，不论病情处于哪个阶段，膈肌起搏都不适合于治疗ALS。

Lancet Neurol. 15, 1217–1227 (2016);
Lancet Neurol. 14, 883–892 (2015).

神经营养因子 (NEUROTROPHIC FACTOR, NTF)

干细胞神经营养因子疗法是安全的

临床研究证实，用能够分泌神经营养因子 (neurotrophic factors, NTF) 的干细胞 (Stem cell) 来治疗ALS是安全、有效的。

NTF是一类小分子蛋白质和多肽的统称，它们能够帮助神经细胞的生长和存活。ALS动物模型研究发现，NTF可以延缓神经病变、修复受损的运动神经元细胞，而且使用不同的NTF，还具有协同作用。可是给ALS患者直接使用NTF却没有任何临床效果。于是，以色列耶路撒冷哈达萨希伯来大学医学中心 (Hadassah-Hebrew University Medical Center, Jerusalem) 的Dimitrios Karussis等人尝试使用能够分泌多种NTF的干细胞来治疗ALS。

Karussi等人在美国新泽西州大脑风暴细胞治疗公司 (BrainStorm Cell Therapeutics, based in Hackensack, New Jersey) 的资助下，连续开展了两个临床试验，一共有26名

患病不到两年、病情各异的ALS患者接受了试验治疗 (go.nature.com/2wj9c09及go.nature.com/2w9uhfq)。首先，他们从这些患者的骨髓里分离出自体干细胞；然后进行刺激，使其能够分泌多种NTF；接着，再将这些干细胞回输到患者体内 (通过肌注或脊髓内注射方式)。试验发现，这种治疗方式是安全的，不过大部分患者都会出现轻度的、一过性的不良反应，比如头痛、发热、腿部疼痛和背痛等。

根据治疗前后的ALSFRS-R评分 (这是一个评估ALS患者语言、唾液分泌、吞咽、呼吸、运动和自理能力等功能的综合评分系统) 结果，研究人员发现，干细胞NTF疗法可能具有延缓病情进展的作用。后续研究也正在开展，以进一步评估这种疗法的临床作用 (go.nature.com/2fkhwhy)。

JAMA Neurol. 73, 337–344(2016)。

抗氧化剂 (ANTIOXIDANTS)

依达拉奉可以延缓患者身体机能的衰退

一项3期临床试验发现，抗氧化剂依达拉奉 (edaravone) 可以延缓ALS的病情进展。

高水平的活性氧 (reactive oxygen species) 可以导致细胞损伤，也与包括ALS在内的许多疾病有关。抗氧化剂依达拉奉能够清除这些活性氧分子，从而对神经元细胞起到保护作用。依达拉奉于2001年在日本上市，用于治疗急性缺血性卒中 (acute ischaemic stroke)。对2014年开展的一项临床试验的数据进行亚组分析发现，依达拉奉可能对部分ALS患者也有保护作用。

日本东京田边三菱製薬株式会社 (Mitsubishi Tanabe Pharma, Tokyo) 的 Makoto Akimoto 等人最近开展了一项临床试

验，以了解依达拉奉对于早期ALS患者 (即呼吸功能和其它机体功能都较好的患者) 的保护作用 (go.nature.com/2xtrlje)。该临床试验一共有来自全日本31家医院的137名ALS患者参与。

ALSFRS-R评分显示，ALS患者接受依达拉奉治疗半年之后，身体机能衰退的速度明显减慢。

2015年，日本批准可用依达拉奉治疗ALS。2017年5月，FDA批准可用依达拉奉治疗ALS，这也是目前市面上第二款治疗ALS的药物。

Lancet Neurol. 16, 505–512 (2017)。

联合治疗方案

复方制剂Nuedexta可以改善ALS患者的生活质量

ALS会使患者的生活质量持续下降。因此，我们急需可以保护患者身体机能的药物。不过，大部分控制症状的药物都还没有在ALS患者群体中开展过临床试验，来验证它们的功效。美国加利福尼亚州神经研究中心 (Center for Neurologic Study, La Jolla, California) 的 Richard Smith 等人开展了一项2期临床试验，以了解氢溴酸右美沙芬 (dextromethorphan) 和奎尼丁 (quinidine) 的复方制剂Nuedexta对保护ALS患者身体机能 (包括语言、吞咽和唾液分泌等功能) 的功效。一共有来自7家医学中心的患者参加了这个试验 (go.nature.

com/2jnaw0b)。

一共有60名病程不到两年的ALS患者参加了这个交叉对照试验项目。他们经过药物 (Nuedexta或安慰剂) 治疗28~30天，然后经历一段10~15天的洗脱期，再转换使用另外一种药物 (Nuedexta或安慰剂) 治疗28~30天。然后患者们会对治疗效果进行自我评估。结果发现，Nuedexta有明显的功效。

研究人员正在准备开展3期临床试验，以了解Nuedexta的长期保护效果，以及该药物是否对延缓病情进展也有作用。

Neurotherapeutics 14, 762–772(2017)。

单克隆抗体药物

Ozanezumab没有价值

Nogo-A蛋白是一种能够阻止神经细胞生长的因子。研究发现，特异性靶向该蛋白的单克隆抗体药物Ozanezumab对ALS没有治疗作用。

肌力持续减低是ALS的标志性体征。动物实验及患者人体组织研究发现，高水平的Nogo-A蛋白是使神经无法继续控制肌肉，损伤肌肉功能的原因。2014年，第一个Ozanezumab临床试验证实了该药物的安全性（go.nature.com/2jl2jdv）。

于是，英国伦敦的GlaxoSmithKline公司又启动了Ozanezumab 2期临床试验，来了解该药物对ALS的治疗作用（go.nature.com/2xkqclw）。

一共有来自11个国家、34家医院的303名患者参加了这个对照临床试验。患者们经过46周治疗（每2周用药一次），然后在治疗结束的第2周和第12周进行疗效评估。

GlaxoSmithKline公司的Arseniy Lavrov和国际合作小组的同事们发现，Ozanezumab并不能改善患者的ALSFRS-R评分和存活情况，而且还有很多包括死亡在内的副作用。

研究人员最后这样总结，试验结果表明，我们无需再为Ozanezumab治疗ALS开展后续的临床试验工作了。

Lancet Neurol. 16, 208–216 (2017)。

老药新用

抗寄生虫药能够明显降低ALS标志物的水平

乙胺嘧啶（pyrimethamine）原本是一种用于治疗弓形虫（toxoplasmosis）和球虫（isosporiasis）感染的抗寄生虫药物，然而近来却发现，该药物可以明显降低ALS患者体内相关标志物的水平。

乙胺嘧啶过去也被广泛用于治疗疟疾，直到后来出现了耐药性。之前的一项开创性研究发现，乙胺嘧啶可以明显降低SOD1基因发生突变的ALS患者白细胞内和脑脊液内超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD1）的水平。

SOD1基因突变与20%的家族型ALS病例，3%的所有ALS病例有关。动物及人体研究发现，高水平的SOD1蛋白与病情的进展有关。

美国纽约特种外科医院（Hospital for Special Surgery in New York）的Dale Lange与国际同行们一起，开展了一项大规模的、长期的1/2期临床试验。期间一共有32名ALS患者参加了该试验。这些患者的病情各异，体内SOD1基因突变情况也不尽相同（go.nature.com/2hkpdor）。所有患者都接受了9个月的乙胺嘧啶治疗。

结果发现，乙胺嘧啶治疗可以使患者脑脊液里的SOD1水平降低10%。不过研究者也指出，虽然这个结果有明显的统计学意义，但还需要开展更多的研究，来判断乙胺嘧啶是否能够延缓ALS的进展。

Ann. Neurol. 81, 837–848 (2017)。

五、药物疗法： ALS最新治疗技术进展



患者自身的干细胞有望治疗ALS。

虽然ALS目前还是无法治愈的，不过我们已经看到了一线希望。

几十年来，神经变性疾病ALS一直都是一个可怕的对头。不仅仅是因为这种病会给患者带来巨大的灾难，而且还因为该病无药可医。今天，虽然研究人员仍然对这种疾病束手无策，不过令人欣慰的是，我们已经看到了一点胜利的曙光。

目前，还没有彻底治愈ALS的办法，甚至无法阻止这种疾病的进展。不过有可能延缓病情进展的药物已经出现了，更可喜的是，有望彻底治愈这种疾病的治疗方案也在逐渐成型。

日本研发的依达拉奉（edaravone）是最有希望，同时也是广为人知的治疗ALS的药物，该药于2015年在日本获批上市。2017年5月，依达拉奉又成为二十多年来第一款获批在美国上市的ALS治疗用药。依达拉奉的商品名为Radicava（或Radicut），这是一种小分子抗氧化类药物（antioxidant），已经在临床上使用多年，不过之前主要用于治疗中风（stroke）患者。2015年，Mitsubishi Tanabe Pharma Development公司位于美国新泽西州的美洲新药研发部门的主任Joseph Palumbo领导的科研团队发现，依达拉奉也能够有效地延缓早期ALS患者的病情进展。

依达拉奉并不是唯一一款治疗ALS的新药。炎症相关的酪氨酸激酶抑制剂马赛替尼（masitinib）也是非常有效的一款药物，因为神经炎症也在ALS的发病过程中起到了

非常重要的作用。美国弗吉尼亚州立邦联大学（Virginia Commonwealth University in Richmond）多年来一直从事神经变性疾病研究的James Bennett认为，在ALS治疗领域，马赛替尼的前景要比依达拉奉更好。马赛替尼是由法国巴黎的AB Science公司研发的一款新药，它与神经递质阻断剂利鲁唑（riluzole）联用能够有效地延缓ALS的进展。多年来，利鲁唑一直就是治疗ALS的主流用药，而且是唯一选择。不过ALS Worldwide等组织也一直在尝试选择其它未获得治疗ALS适应症的药物来治疗这种疾病，当然，这并非主流的治疗方案。

美国麻省总医院（Massachusetts General Hospital in Boston）ALS项目组的组长Merit Cudkowicz则非常重视tirasemtiv这种能够活化肌肉组织的小分子药物。Cudkowicz指出，这也是唯一一款能够改善ALS患者呼吸机能的药物，我们知道，呼吸困难是最让ALS患者痛苦的，也是患者最终致命的原因。

Cudkowicz表示认为，我们已经迎来了一个转折点，这些新药都是真的有效的。Cudkowicz之所以这么乐观是因为，有越来越多的证据表明，药物之间有叠加效应（即药物联用的效果要超出药物单用效果之和），比如马赛替尼和利鲁唑联用。Cudkowicz认为，也许可以利用这种叠加效应，将某几种药物联合在一起，阻断（而不是延缓）ALS的进展。

分子遗传学研究带来的新希望

我们之所以还无法战胜ALS，原因之一就是还不清楚这种疾病的病因。Bennett认为，个体化抗癌治疗领域的进展也会惠及ALS的治疗工作。因为ALS的病因也是非常复杂的、多元化的，所以也不应该用同一种药物治疗每一

位ALS患者，应该开发ALS患者相关的、更加个体化的治疗方案。

Bennett认为，这其中的关键就在于加快分子遗传学研究的进展，我们知道，分子遗传学研究就是肿瘤个体化治疗的基础。现在，

世界各地的科研人员也都已经将DNA和RNA测序作为常规检测手段，来寻找与ALS有关的基因和突变。基因调控和改造的技术也都已经进入临床，并用于疾病的治疗。Cudkowicz也认为，分子遗传学研究一定能够帮助我们阻止ALS的进展，甚至彻底治愈这种疾病。因此Cudkowicz就非常看好反义链疗法（antisense therapy）。美国ALS东北协会（Northeast ALS Consortium）已经选择了几个临床试验基地，并已开展反义链分子治疗药物的初期临床试验工作，而Cudkowicz也是这个协会的联合创始人之一。

所谓反义链分子就是一小段DNA或者RNA等寡核苷酸片段。这些核酸片段能够与mRNA特异性结合，起到阻断相应靶基因的作用，其最终目的就是减少这种基因的表达，导致ALS的蛋白量下降。

修复异常基因和细胞

用正常的基因替换、修复细胞里的异常基因，这种基因疗法则是更有效，可以彻底根除ALS相关遗传致病因素，并治愈疾病的一种方法。不过如何替换正常基因，并让它们正常工作，以及应该替换哪些基因，目前还存在一些困难和障碍。但是大家越来越相信，可以用基因疗法治愈ALS。美国宾夕法尼亚大学罕见病中心（Orphan Disease Center at the University of Pennsylvania in Philadelphia）的主任James Wilson在2017年1月启动了一个研究项目，尝试使用基因疗法来治疗疾病，他相信，现在已经到了大力开展基因疗法治疗ALS的时候了。

Wilson希望能够在基因治疗临床试验中取得一些成果。他们采用的技术是病毒载体技术，即利用这些人工改造过的病毒，将正

确的基因导入人体细胞内，使其发挥正常作用，达到治愈疾病的目的。这一次，他们治疗的是脊髓性肌萎缩（spinal muscular atrophy, SMA）。虽然SMA的致病基因与ALS不同，但是最终都会使人体的运动神经元细胞受损。

除了这些运动元神经细胞之外，其它一些受损细胞也是我们在利用基因疗法治疗ALS时可以选择的靶标。比如对神经胶质细胞（glial cell）里的基因进行干预，也有助于保护运动神经元细胞的功能。有研究发现，虽然ALS患者体内的运动神经元细胞大量死亡，但其中很大一部分原因都是因为神经胶质细胞在背后捣鬼。

还有一种方案也具有长期的疗效，甚至达到治愈的效果，那就是干细胞疗法（stem-cell therapy）。世界多家科研机构正在对干

细胞疗法开展研究，以了解这种方法能否起到帮助运动神经元细胞存活，保存其正常功能的作用。以色列耶路撒冷Hadassah医学中心（Hadassah Medical Center in Jerusalem）开展了一个2期临床研究项目，结果发现，干细胞治疗可以有效抑制ALS病情进展，显效率达到了87%。他们的治疗方案是提取患者自身骨髓干细胞，然后在体外培养，并刺激干细胞分泌神经生长因子，然后再将这些人工处理过的干细胞回输给患者，进行干细胞治疗。

美国梅奥医学中心（Mayo Clinic in Rochester, Minnesota）的神经学家Anthony Windebank和Nathan Staff也正在开展干细胞治疗研究工作，他们使用的是从脂肪组织里分离得到的间充质干细胞（mesenchymal stromal cell）。这些细胞能够分泌帮助运动神经元细胞存活的因子，也可以支持免疫系统。我们知道，免疫系统与炎症反应也与ALS的发

病有关，因此，这些间充质干细胞也可以通过这种方法起到治疗作用。目前，Windebank等人已经完成了1期临床试验，证实了这种疗法的安全性和耐受性。他们正在准备开展2期临床试验工作。

基因治疗和干细胞治疗还可以结合起来，比如在干细胞里添加某些基因。美国加利福尼亚州旧金山市Cedars-Sinai医学中心（Cedars-Sinai Medical Center in Los Angeles, California）已经在2016年底获得了FDA的批准，得以开展相关治疗的1期临床试验。

虽然目前ALS还是一个不治之症，但我们已经从多个角度向这个难题发起了猛烈的攻击。Cudkowicz认为，在这些新治疗方案中，至少有一至两种治疗新技术极有可能进入临床实践。让我们和ALS患者拭目以待吧。

更多阅读：老药新用——药物的非适应症使用（OFF-LABEL）



Stephen Byer正在给一位患者进行咨询。

药物开发是一个艰巨而又漫长的工作，因此，医患双方，以及患者的家人都在想尽一切办法给患者提供帮助。比如使用那些未在当地获得治疗ALS适应症的药物来治疗这些患者，即所谓的药物超适应症使用。这种情况非常常见，尤其是在患有难治疾病的患者群体中，这些无助的人们总是尽可能地抓住一切机会，哪怕胜算非常渺茫。“ALS Worldwide”也正在与医学专业人士合作，打算在正规的临床实践之外，再开辟一条新路，为ALS患者提供帮助。

2008年，美国一位年轻的男性ALS患者不幸病逝，他的父母就创办了“ALS Worldwide”。该机构不仅为患者们提供帮助和支持，也会提供药物，其中就包括超适应症药物。不过该组织表示，他们提供这些药物都是有确凿的临床证据，可以证明药物疗效的。这些药物包括甲钴胺（methylcobalamin）、谷胱甘肽（glutathione）、硫酸阿托品（atropine

sulfate）、Nuedexta（即氢溴酸右甲吗南和硫酸奎尼丁的复方合剂）等。

“ALS Worldwide”的创始人，联合CEO Stephen Byer表示，我们能够自由地提供超适应症使用建议，帮助ALS患者缓解临床症状。而且有一些药物，在我们给出推荐之前，并不被主流医学界认可，可是现在，已经获得了专业人士的承认。

意大利米兰大学医学院（University of Milan Medical School in Italy）的神经学家、ALS研究人员Vincenzo Silani就是“ALS Worldwide”的粉丝，他指出，该组织的确给众多ALS患者提供了非常大的帮助，但是如果缺乏足够的临床证据，医学专业人士也不会为该组织推荐的每一款药物提供肯定的支持意见。

尽管“ALS Worldwide”在努力让各国的患者都能用上同一种治疗方案，但是目前该疾病还是不可治愈的。临床用药的效果还仅仅局限在缓解症状，最多也就是延缓病情进展而已。

六、为ALS筹集资金： 冰桶挑战大获成功



2014年，上百万人参与了冰桶挑战赛，他们希望为ALS筹集资金。那么这场公益营销真的值得吗？

2014年春天，遗传学家John Landers等人向美国慈善协会ALS协会（ALS Association）申请100万美金的研究经费。研究人员希望通过全球性的努力来破译ALS的遗传机制。他们将用这笔钱加入Project MinE项目——一项旨在对数百万名ALS患者和健康个体进行测序的国际性合作项目。

这样的项目费用不菲。Landers指出，对个体整个基因组进行测序的费用为2000美元，而Project MinE的目标是为22,500个个体进行测序，共需4500万美元，这还不包括分析大量数据集所需的设备和工作时间。虽然作为美国除联邦政府以外最大的ALS研究资助者的ALS协会很赞同Project MinE的目标，但他们并没有充足的资金来资助这个项目。

2014年夏天，事情有了转机，一项名为冰桶挑战赛（Ice Bucket Challenge）的筹款活动燃爆整个社交媒体。参与者只要使用冰水浇遍全身，然后将视频发布到社交网络上，就可以指定其他某个人来参与这一活动。活动中，许多参与者向ALS组织，包括ALS协会捐款，很快该活动引起了全社会对ALS的关注。

据Landers回忆，冰桶挑战赛让ALS协会终于能够资助他们的项目了。随后，Landers拿着这笔钱，带领他在麻省大学医学院（University of Massachusetts Medical School）的团队和埃默里大学（Emory

University）的同事顺利启动了Project MinE的美国子项目。

冰桶挑战赛的参与者多达1700多万人，其上传的视频被世界各地约4.4亿人观看超过100亿次。知名度高的参与者包括慈善家Bill Gates，谈话节目主持人Oprah Winfrey和卡通人物Homer Simpson。

虽然大多数参与者都是普通人，但他们做出的贡献不可忽视。截至2014年夏末，全球共有超过2800万人捐赠了约2.2亿美元，远远超出以前的ALS研究预算。

但是随着资金的大量涌入，批评也随之而来。有人称这种运动是一种“懒汉行动主义”，只是让人自我感觉良好，实际上并没有激励多少实际的行动，比如更改头像来支持ALS。另外一些人则担心，ALS捐款的激增使得资金远离了更迫切的健康问题，比如更紧迫的心脏病和西非的埃博拉疫情，从而导致更多的死亡。在资金普遍不足的年月，人们甚至抱怨水的浪费。

三年后，受冰桶挑战资助的研究日益增加。尽管有批评声音，但是包括Landers在内的研究人员已经取得了一系列成果，如发现了新的ALS致病基因、新的干细胞模型，并进一步了解了相关蛋白质。这些成果证明了冰桶挑战赛的价值。

走向全球

虽然冰桶挑战的确切起源备受争议，但一开始冰桶挑战似乎是作为一种鼓励公众捐款的营销手段。参与者使用冷水浇遍全身，然后把视频传到社交媒体上，便可以点名要求别人做同样的事情，或者捐款给慈善机构。捐款的原因多种多样，从支持癌症研究到支持市长选举

都有。

2014年7月中旬，佛罗里达州职业高尔夫球手Chris Kennedy参加了ALS挑战，因为他有个亲戚患有这种疾病。自此之后，这种现象通过成熟的筹资网络传递到马萨诸塞州波士顿的前棒球运动员Pete Frates处（Frates是

拥有大量粉丝的ALS患者)。华盛顿特区ALS协会通讯和发展副总裁Brian Frederick指出，Frates的支持者把这股风吹到了全球。



前篮球运动员、因ALS而致残的Pete Frates引发了冰桶挑战。

冰桶挑战为ALS协会带来了1.15亿美元的捐款，约占全球募集资金的一半，去年同期该组织只募集到280万美元。其他ALS组织，包括加拿大ALS协会和英国运动神经元疾病协会（Motor Neuron Disease Association）也接受了大量捐款。

在冰桶挑战之前，Frederick指出，ALS协会每年拨款600万美元资助研究项目。而冰桶挑战后，每年约有1900万美元，迄今为止一共有715万美元来自冰桶挑战。相比之下，NIH在2017年将花费大约5500万美元用于ALS，在2013年，这个数字是3900万美元。

冰桶挑战募集来的资金已经对科学产生了影响。Landers的团队使用这笔钱，识别了一个名为*NEK1*的ALS相关基因。在2016年发表的论文中，研究人员指出，该基因的突变是3%的ALS病例的发病原因，它是该病最常见

的已知遗传因素之一。这一发现促进了科学家对疾病发展的了解，并有助于开发新药物。最近Landers团队又有了新发现，他们正在撰写相关论文。

ALS协会使用冰桶挑战募集来的资金资助了十多个科研项目，还资助了一些ALS宣传和病人护理项目。约翰霍普金斯大学（Johns Hopkins University）的Philip Wong团队也获得了ALS协会的资助。Wong使用这笔基金，在过去两年里，一共发表了3到4篇论文。

Wong表示，自2006年以来，他的团队一直在研究一种名为TDP-43的蛋白质。ALS患者体内该蛋白聚集在一起。但研究人员陷入了僵局，他们试图了解这种蛋白的基本生物学机制，然而一无所获。

Wong指出，来自冰桶挑战的资金主要用于RNA测序分析和一名研究生的工资。一年后，该团队报告了TDP-43聚集导致细胞死亡的机制，为疾病干预提供了可能的治疗靶点。Wong表示，来自冰桶挑战的资金并不是他们唯一的经济来源，但这笔钱来得正是时候，恰好是ALS研究大爆发的时候。这是令人兴奋的时刻。

事实上，冰桶挑战不仅仅募集了大量捐款，也提高了公众对该病的认识。在挑战高峰期间，ALS协会网站的访问量从平均每天20,000次上升到450万次。运动神经元疾病协会（Motor Neuron Disease Association）网站的点击率从平均每天1,400次增加到153,000次。Google搜索和Twitter中以ALS为关键词的检索次数也大幅增加。

在这次热潮中，大量与ALS无关联（自己或亲友无人患ALS）或平时不习惯给慈善机构捐钱的人都参与了进来。ALS协会的大多数捐助者只给予了少量捐赠。根据一些分析，这意味着，冰桶挑战并没有影响公众对其它疾病的捐款。

Landers认为，ALS已经从小众词

汇，变成了一个家喻户晓的词汇。当他告诉人们他的工作时，他得到了一些有趣的评价。他

不用再向别人解释ALS是什么了。公众对ALS的认识远远超出了他们的设想。

长期前景

冰桶挑战不会一直持续下去——甚至可能不会持续很久。2014年9月，捐款已经下降到接近冰桶挑战前的水平。虽然捐款仍然比挑战之前略高，但是重复这一现象的尝试还没有结束。

英国剑桥大学（University of Cambridge）社会心理学家Sander van der Linden指出，这是一个熟悉的模式。病毒式传播活动的热度会快速消退，特别是当捐赠的动力来自内部信仰，而不是来自外界的社会压力时。他发现，在奖品激励的情况下，大学生在为期一个月的环保竞赛的头三个星期内使用的能量要少得多。但到最后一周，他们会故态复萌，和竞赛前使用差不多的能量。

在2017年的一项研究中，van der Linden搜索了跟冰桶挑战类似的活动，并发现了另外两个“病毒利他主义（通过社交网络传播有益的行为）”案例。拯救达尔富尔运动（Save Darfur）是一个反种族灭绝运动，短时间内在Facebook上吸引了超过100万粉丝。而2012年捐赠器官活动倡议在Facebook上大获成功，在短短两个星期内增加了4万粉丝。像这样的活动往往会引发强烈的情绪，如同情或愤怒，同时包含一个道德因素，激起人们想要提供帮助的想法。

“冰斗挑战”从“殉道效应”得到了额外的推动：人们能感受到痛苦或牺牲时，认为自己的捐赠更有价值时，他们愿意捐赠更多。同时，冰桶挑战也以专业的方式利用社交媒体的

力量，迅速制定社会可接受行为的新规范。名人的参与又起到了促进作用。

然而，冰桶挑战赛的病毒性质意味着其难以长久。van der Linden表示，当十亿人点击某事时，人们不是因为感兴趣而阅读其内容，这种参与其实是浅层次的。

van der Linden将冰桶挑战与关注男性健康的“大胡子月”（一个鼓励男性每年11月份增加胡子，并带来一个较小但稳定的流动资金的活动）进行了对比。他认为，一个主要区别是，Movember培养了具有共同价值观和关注点的参与者之间的身份认同感。相比之下，冰桶挑战赛则要求人们在自己的经验之外（毕竟ALS与大部分人无关）捐助一个项目。当捐助的原因是一种罕见的疾病，或者是抽象的、距离自己很远的事物时，人们往往会觉得捐一次就已经尽到自己的责任了。

对于一些挑战参与者，可能是事后才了解ALS的。他们在参与的时候，甚至可能并不了解这个活动是在为ALS筹集善款。宾夕法尼亚州费城的数据分析公司RJMetrics针对1500部挑战赛视频的分析显示，26%的视频没有提到这种疾病。而在没有提及该病的人中，只有5%给ALS捐了钱。即使是在视频中提到了ALS的人中，也只有25%捐了钱。

Van der Linden指出，这些因素都不影响冰桶挑战对于ALS研究的价值，并且研究人员和患者都感激不尽。Pat Quinn就是其中一例。他与Frates和Kennedy一起被认为是冰桶

挑战的发起者，因为他连接了其他两个人的社交媒体。2011年，28岁的Quinn注意到自己的左手臂抽搐，导致手臂无力，脖子和腿部也发生了这种情况。他现在只能依靠轮椅和喂食管来生存，连说句话都要耗尽九牛二虎之力。

Quinn在邮件里提到，冰桶挑战的成功对他来说意义重大。现在如此，将来也依旧如此。它真的唤醒了世界对一种毁灭性疾病的认识。冰桶挑战是终结ALS的开始。



百态·频道

www.LifeOmic.com

七、观点

1. 我们不应将关注点局限在家族史上



Ammar Al-Chalabi认为，我们应该关注ALS的病因，而不是家族史。

所谓家族型ALS（familial ALS）和散发型ALS（sporadic ALS）都已经是过时的概念了，而且这些提法也不合逻辑。这种分类方法已经阻碍了科研的进展，它既会让我们的思维发生混乱，也会让患者混淆。是时候抛弃这些陈旧的观念了。

ALS研究的最主要目的就是弄清楚致病因素。有一种观点认为，只要弄清了遗传（等同于家族型病例）及环境致病因素（等同于散发型病例），就可以帮助我们开发出新的治疗手段和药物。这是基于这样一个假设，即导致ALS发病的因素和使病情持续的因素是相同的，可是这里存在一个思维误区。我们一直被告知，5~10%的ALS患者是具有家族史的，而大部分ALS患者都属于没有家族史的散发型患者。这种区分方法从一开始就让我们科学研究，不论是在研究设计，还是在实验结果解读上，都走上了歧路。比如，我们一直都认为散发型ALS等同于没有相应孟德尔式致病基因的ALS，可实际情况却并非如此。抑或我们发现了某个导致家族型ALS的突变基因，可是散发型患者却同样携带这些基因。这种模糊不清的分类方法给临床工作和患者本人都带来了很大麻烦，比如遗传咨询门诊往往就是为有家族史的患者服务的。

基于上述原因，我们认为不应该再使用家族型ALS和散发型ALS这种分类方法了。首先，神经学家们对所谓“家族型（familiality）”有各种各样的定义。假设某位女性自己、她的父亲，以及她的叔叔全都是ALS患者，那么按照传统的定义，这肯定是一个ALS家系了，可是并非所有人都赞同这个观点。另一方面，还有一些专家认为，如果在一个拥有比高祖更高一代的大家系（fourth cousins）中，出现了一名ALS患者，那么这也算是家族型ALS。

哪怕我们对家族型疾病的定义一直保持不变，而且也获得了大家的公认，我们还是不知道应该如何判断哪些才是阳性的家族史。比如，直到近十年来，我们一直都认为ALS患者是否有额颞痴呆（frontotemporal dementia）的家族史并不重要。不过现在我们发现，有多个ALS相关基因也都能够导致额颞痴呆。那么是否还有其它一些类似的情况也被我们忽略了？如果我们真的认为只有家族内的患者才应该接受遗传检测，或者只有他们才可能影响自己的后代，那么这对散发型的患者也是不公平的，因为他们同样存在这样的风险。实际上，症状明显的散发型患者的一级亲属罹患ALS的几率要比普通人高8倍。

我们还需要注意，统计学的效力也会影响家族史的作用。以80岁计，ALS的终生风险

(lifetime risk, 流行病学中是指在一段时期内特定人群发生疾病的比例, 用来测定发病风险。当所考虑的时期为整个人生时, 则称为终生风险)是1/300。由此可以推算出, 平均每100万个家庭中就会有1个患病家庭, 出现2名患者, 而这并不是因为他们具有相同的致病因素。根据美国和英国的人口来推算, 大约在美国会有120个ALS家庭, 而英国则会有35个。另一方面, 在父母都携带了明确高危基因的家庭中, 这种遗传的结果却往往是出现了所谓的“散发型”患者。这主要是因为以下两点原因。首先, 并非所有遗传了致病基因的人都会发病。其次, 因为致病基因遗传的几率是50%, 所以在规模较小的家庭中, 这些致病基因传递下去的几率也比较小。因此, 我们很难武断地认定, 整个家族中只有一位患者的家系就不如有好些患者的家系更有价值。

已经有证据显示, ALS的发病过程其实是一个多步骤的渐进过程。在分子学层面来看, 该病平均有6个致病步骤, 这与某些癌症是一样的。因此, 某个高危遗传学突变其实是多个因素综合作用的结果, 这也就解释了为什么携带这些高危突变的人更容易患上某种疾病。这也提示我们, 应该在这类人群当中寻找环境高危因素, 因为可能综合起来, 这就是导致疾病

发生的致病原因了, 而这一切都与是否存在家族史无关。

除此之外, 我们也很容易看到家族型和散发型分类方法的弊端。让我们以C9ORF72突变基因这个最常见的ALS突变基因为例。在家族型患者中, 大约有45%的人携带了该基因, 因此这也是最重要的家族型ALS致病因素。可是在缺乏明确家族史的患者人群中, 该基因的携带比例也达到了10%, 因此它也成为了最重要的散发型ALS致病因素。实际上, 在所有ALS患者中, 该基因的携带率也达到了14%, 而且其中大部分人都是没有相关家族史的。由此可见, 我们怎么可能根据是否有家族史, 来给予不同的患者不同的临床治疗呢? 因此, 真正重要的并不是家族史, 而是真正的致病因素。所以, 我们应该关注C9ORF72突变基因在ALS中起到的作用, 而不是是否存在家族史。家族史对于患者自身、患者家族、科研人员, 以及致病机制其实都没有作用。

现在, 我们很容易地就可以开展基因测序了, 而且价格也十分低廉, 所以我们也应该抛弃家族型和散发型这种落后的分类方法, 通过真正的病因来认识每一位患者。只有这样, 我们才能更清晰地认识疾病、发现致病因素, 从而更好地为每一位患者提供服务。

2. 解密ALS的《X档案》



Richard Bedlack将向我们介绍解放思想给他的工作带来的帮助和成果。

在经典美剧《X档案》（*The X-Files*）里，男主角Fox Mulder妹妹Samantha的意外失踪，彻底改变了他的人生。Mulder坚信一定是外星人绑走了他妹妹，并从此走上了调查超自然现象的职业道路。

我自己也有一个“Samantha妹妹”，她是一名我的ALS患者。她之所以让我印象深刻，是因为她参加了一个临床试验项目。该项目的目的是利用能量疗法（energy healing），进行自我治疗（self-experimenting）。而她选择这么做是因为她看了一位能量治疗师的网页。该网页介绍了一位晚期ALS患者在接受能量治疗之后彻底康复的故事。

此后，我了解到，绝大部分ALS患者都曾借助过各种手段，进行自我治疗。原因显而易见：虽然我们在临床上可以缓解这些患者的症状，但是目前还没有办法让失能的患者恢复身体机能；或者阻止病情进展，保存患者的身体机能；当然也无法延缓病情，挽救患者的生命。与Mulder一样，ALS患者和他们的亲人更愿意相信，有一种神秘的力量可以帮助他们。

于是，互联网上出现了各种超自然力量，它们全都宣称可以治疗这种疾病。支持者们都表示，这些疗法都是安全而且有效的。而他们的证据就是各种引人入胜的神奇传说。让情况更加复杂的是，ALS的自然病程并不是呈线性发展的，在这种疾病的发展过程中，经常会出现病情突然稳定，甚至有所缓解的情况，此时很多人都认为是治疗的功效。除了这些自我治疗措施的功效往往被人夸大，大家也都没有注

意到这些疗法给患者的身心带来的伤害，以及经济上的负担。

这些开展自我治疗的患者还会寻求神经内科医生的指导，而医生们的做法就各有不同了。有的医生会采取家长式的作风，完全不同意任何没有治疗价值，甚至是有害的治疗方案；有些医生则会将选择权留给患者自己；还有一些医生会与患者进行讨论，了解相关的证据和信息，帮助他们做出决定。虽然最后这种方式是最多被医生和患者接受的方式，也会取得更好的治疗效果，但很多医生都对此担心，因为这种方法太费时间了。

我自己也倾向最后这种医患双方共同决定的诊疗模式。为此，我在2009年时还启动了ALSUntangled项目（详见www.alsuntangled.com），目的是系统性地回顾各种ALS替代疗法。我们的团队由来自10个国家的100位临床医生和科研人员组成，患者和他们的家人会通过电子邮件或推特等方式，给我们发来各种治疗方案和体会。我们会仔细查看每一条记录，然后将这些记录归入可能的机制（mechanistic plausibility）、临床前数据（preclinical data）、病例轶闻（cases）、临床试验（trials）和风险（risks）这5个大类中。在每一大类中，又都有A至F六个等级，A表示可信度最高，F为最低，而且设立了客观的评定标准。所有的工作最后都会被上传至我们的网页，也都发表在《肌萎缩侧索硬化症与额颞叶变性》（*Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*）杂志上，我们的这项工作是该杂志有史以来下载量最高的。

与Mulder一样，我的探求真理之路也获

得了各种经验和教训。这些替代疗法的支持者也不都是卖假药的，他们中有些人真的认为自己的那一套有作用，只不过他们不会、或者不愿意去验证罢了。但也有一些非常匪夷所思的疗法，比如椰子油和大便秘植法（**coconut oil and faecal transplants**）——这听起来的确有点道理，应该做个临床试验来验证一下。而最神奇的是在那个能量治疗师网页上介绍的彻底痊愈的病例。我曾经亲自拜访过那名患者，也查看了她的病历记录。而她并不是唯一一名痊愈的ALS患者，我还亲眼见过另外33名康复者。

他们之所以能够痊愈，可能有以下3点原因（这也是我们今后需要进行深入研究的方向）：首先，他们并没有做诊断ALS的试验检测，所以其中有些患者可能患上的是与ALS非常类似的疾病，然后自愈了。比如他们可能患上的是多发性运动神经病变（**multifocal motor neuropathy**）、重症肌无力（**myasthenia gravis**）和乳糜泄（**coeliac**

disease）等抗体介导的疾病。我准备对这些患者进行相应的验证工作。其次，这些患者体内可能存在某些突变（遗传多态性），因此对ALS具有天然的抗性。这种情况并非没有先例，比如我们熟悉的对HIV病毒具有天然抗性的个体。我也会对这些ALS患者进行基因组测序，看看是否真的存在这种抗性基因。最后，也是最难证明的就是，这些疗法真的有效。毕竟，伟哥（**Viagra**）和**Nuedexta**这些老药新用的成功案例也经常出现。我现在就正在开展以患者为中心的前期试验，看看这些康复患者使用过的药物是否真的有效。

在《X档案》里，**Mulder**为了彻底查明**Samantha**的失踪原因，最终找到了一大堆有外星人存在的证据。而我为了帮助那些ALS病患家庭，也已经找到了新的药物和患者，即将开展临床试验，来验证这些疗法的功效。我很想知道，为什么有些ALS患者能够痊愈，能否做些什么让更多的患者痊愈。打开思路，在科学的指引下，你将会发现一片全新的天地。

原文检索：

Elie Dolgin. (2017) Genetics: The hexanucleotide hex. *Nature*, 550:S106-S108.

Carolyn Brown. (2017) A tangled web. *Nature*, 550: S109-S111.

Neil Savage. (2017) Calculating disease. *Nature*, 550: S115-S117.

RESEARCH ROUND-UP. (2017) *Nature*, 550: S118-S119.

Andrew Scott. (2017) On the treatment trail for ALS. *Nature*, 550: S120-S121.

Emily Sohn. (2017) Fundraising: The Ice Bucket Challenge delivers. *Nature*, 550: S113-S114.

Ammar Al-Chalabi. (2017) Don' t keep it in the family. *Nature*, 550: S112.

Richard Bedlack. (2017) *Nature*, 550: S122.

Eason&张洁/编译

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

如何避免PCR技术在微生物研究中的偏倚



美国内华达州的大沸泉（Great Boiling Spring in Nevada）里含有大量的微生物，可是用传统的16S rRNA分析技术却无法认识这些小生命。

在微生物组（microbiome）研究工作中，PCR是极为常用的一种扩增手段，不过有很多因素都会影响PCR结果，目前科研人员正在想办法解决这个问题。

假如你想要研究某个湖里都有哪些微生物，而你手里正拿着一瓶长满了微生物的该湖的水质样品，那么你走运了。可是接下来该怎么做呢？这取决于你想要研究什么问题。

按照惯例，微生物组研究人员会使用PCR技术扩增水质样品里的16S RNA编码基因。这些基因在原核生物间具有明显的种属特异性，所以可以被当作“指纹”来鉴别样品（包括土壤、海水、人体大便样品）中都含有哪些微生物。美国南加州大学（University of Southern California）的海洋微生物学家Jed Fuhrman表示，PCR技术在这个研究领域占据着非常重要的地位。使用PCR技术可以很好地扩增出目标基因，从而给科学研究提供许多非常重要的信息。

不过，现在越来越多的实验室开始使用一种名为“鸟枪宏基因组学（shotgun metagenomics）”的新技术。这种技术会将样品里所有的微生物DNA打成碎片，然后进

行测序、组装，给我们提供更加丰富的、涵盖整个微生物基因组的信息。联合基因组研究所（Joint Genome Institute）的分子生物学家Nikos Kyrpides指出，借助宏基因组学技术，我们可以获得更多的信息。同时他认为，再做16S RNA分析，已经完全没有必要了。随着基因组测序技术成本的不断降低，即便像美国加州大学圣地亚哥分校医学院（University of California San Diego School of Medicine）的Rob Knight这样的16S铁粉，也开始慢慢接受宏基因组学技术了。他表示，只要样品合适，他们已经彻底倒向了宏基因组学技术。

不过很多人还是和Fuhrman一样，依然是16S的拥趸，他们认为16S仍是微生物学家的最佳搭档。据丹麦微生物学会（Denmark's Center for Microbial Communities）的主席Per Nielsen表示，16S分析的速度要快得多，而且可以处理的样品也要多得多。这真的是一种简便、低成本，而且非常可靠的研究手段。

在样品数量有限，或者被其它非微生物细胞严重污染的情况下，更能够凸显16S分析的优势。不过，即便是这帮铁粉也都表示，在样

品来源不同的情况下，16S分析极易产生偏倚，所以他们也都在继续完善这种分析技术。

序列配对的重要性

在整个生命树中，核糖体（ribosomes）是固定不变的。16S rRNA的序列也是高度保守，而且非常特异的。这其中包括9个高度可变区（hypervariable region），以及两端的相对保守序列（conserved sequence）。这种独特的序列在进行物种鉴定时是非常好的生物学标志物。

大部分实验室主要都使用Illumina等公司生产的短片段测序仪（short-read sequencing platforms）进行研究，但是这些设备无法覆盖全长达到1500bp以上的16S编码基因。因此，16S分析主要依靠PCR扩增技术，以其两端的保守区域为目标序列，进行特异性的扩增和分析。早在1977年，Carl Woese等人就首次获得了微生物的16S核酸序列。上世纪九十年代之后，以Sanger测序法为基础的16S核酸分析技术又升级成了效率更高、灵敏度也更高的PCR分析平台。即便到了几十年之后的今天，这些“古老的”技术也没有被淘汰。据Fuhrman介绍，差不多所有真正好的引物，都是在近几年才被发现的。



地球微生物组项目的联合创始人Rob Knight

不过在16S序列的保守区域里，也还是存在一些变异的，只不过程度没有高度可变区那么高。在设计PCR引物时，不那么严格遵循碱基互补配对原则的兼并引物，就可以与变异度较低的序列结合。不过这并不是分析16S序列的最佳方案。美国密歇根大学（University of Michigan）的微生物学家Pat Schloss就认为，当我们在提到通用引物（universal primers）时，这个通用其实是要加引号的。很多‘通用’引物其实很容易发生错配，并不能很好地与目标序列配对结合，因此无法得到目标片段的扩增产物。Knight也指出，不应该简单地将引物和目标序列看成抽象的、其行为高度可预测的序列。这些分子在化学反应里会有完全不同的表现，尤其在特定条件下进行杂交时更是如此。

Fuhrman等人在2016年时曾经做过一项研究，他们证明引物与目标模板之间的不匹配情况完全不可预计。据Fuhrman介绍，在复杂的混合物样品里，即使在序列中部有一个错配，就会导致十倍的预估不足。但是如果样品比较单一，结果就非常漂亮。反应条件的不同也会影响PCR的容错能力。美国明尼苏达大学（University of Minnesota）的Daryl Gohl等人在对一系列16S PCR反应条件进行分析之后发现，某些具有校正功能的PCR聚合酶可以对引物进行“编辑（primer editing）”，来解决序列不匹配的问题（sequence incompatibilities），以避免漏检。Gohl指出，我们现在已经可以发现引物里的错配问题。具有校正功能的PCR聚合酶可以切掉引物

里不匹配的序列，并且对其进行编辑，使引物能够与目标模板更好地配对结合。

因为有些引物“天生”就不能与某些目标模板很好地匹配，所以上述研究工作还可以帮助我们挑选出合适的引物。Schloss表示，他们一直都根据目标检测物来挑选引物，他对于检测肠道微生物的引物非常满意，但他也非常清楚，如果用这些引物来检测皮肤细菌，肯定就会有漏检的情况发生。所以需要对这些引物进行调整，比如让它们可以扩增出痤疮丙酸杆菌（*Propionibacterium*）的片段。对于每一个不同的微生物群落，都会存在这个问题。Kyrpides课题组最近发现利用鸟枪测序法获得的宏基因组数据，在传统的16S分析工作中，有一些“门（phyla）”被漏掉了。这个问题在古细菌（Archaea）这个目前科研人员还比较陌生的领域里显得尤为突出。Kyrpides表示，对于一个谱系（lineages）而言，即便是最好的引物，也会有10%的遗漏率。甚至在某些特定的样品里，这些被漏掉的可能性在整个群体里的比例高达90%。所以Kyrpides等人才发现了一些“新的”细菌门（bacterial phylum）。这些细菌早就隐藏在宏基因组信息

里，但是用现有的16S PCR引物是无法检测到的。

从理论上来说，我们可以设计新的16S引物，来揪出那些“隐藏”的目标，不过Nielsen和他的同事Mads Albertsen却想到了另外一种办法。他们的方案就是瞄准rRNA分子本身，而不是编码它们的基因。他们还使用了一种不依赖核酸序列的分子标记技术（sequence-independent molecular-tagging approach），可以借此扩增出整个rRNA序列，而不再像以前那样，只能扩增出其中的某一两个片段。据Nielsen介绍，在最初的实验过程中，他们用这套技术获得了100万个小亚单位序列——这和其他人20年获得的全长序列一样多。从理论上来说，我们可以用这种技术对地球上的所有生物进行测序，获得真正完整的生命树（tree of life）。不过，Nielsen也指出，他们的方法非常复杂，而且需要花费大量的人力，所以很难取代传统的16S PCR分析技术。不过，我们可以用他们的技术构建参考序列文库，从而帮助科研人员进行16S序列注释。



在进行微生物组样品分析之前，比如在分析美国肠道微生物项目中使用的口腔拭子样品之前，我们必须先选择出最合适的、最有可能扩增出目标微生物的PCR引物。

什么叫群落？

PCR反应是整个16S分析工作的中心，除此之外还存在其它影响因素。比如最开始的DNA样品制备就必须非常小心，针对不同的环境样品要有不同的制备流程。对PCR产物的测序也需要有所变化。英国华威大学（University of Warwick）的生物信息学家Christopher Quince就指出，虽然目前广泛使用的Illumina公司出品的MiSeq等测序仪的可靠性已比过去提高很多（过去的测序技术更容易出错），但结果并不一定如我们想象的一般理想。现在测序仪的出错率与过去相比是更低了，但是新的技术也会带来新的错误，而且这些错误更难解决。比如样品转换（sample switching）问题，即将一个样品的测序结果与其它样品的结果混在一起。

为了避免这些问题的出现，很多微生物组学研究人员都主张在研究工作中使用有效的对照。比如直接在实验样品里加入“内掺序列（spike-in sequences）”来作为实验的标记，或者用更常用的方式，即用人造微生物群（mock communities）作为实验对照组。Schloss表示，在测序工作中，错误率（error rate）等指标是非常重要的，引物的偏倚（primer bias）也同样重要。最理想的状态是，这些引物能够从混杂在环境样品中的一大群微生物里，准确扩增出目标物种。Schloss对此不是很乐观，他认为，如果大家都使用了

人工微生物群对照，哪怕只是对大肠杆菌进行测序，那我们也算幸运了，毕竟这是一个好的开始。

实际上，很多研究工作都没有设置这些对照组，这也是导致很多研究失败的原因之一。Fuhrman认为，设置这些对照还不是一种常规的实验操作，但我真的希望这能够成为标准的实验流程。就像我们做化学实验，也会先用标准品做出一条标准曲线。那么为什么大家都“忘记”设置这些对照组了呢？可能是因为在最开始，就没有养成这种好习惯，因为当时每多增加一组样品，就会增加一次成本，而且当时的研究目的是获得更多的数据，而不那么在乎数据的质量。还有些科研人员认为，在最开始制定实验流程时，设置这些对照是有意义的（比如可以鉴定样品的偏倚等），但是在后面的工作中就没什么价值了。Knight也指出，过度依靠人工对照不仅不会消除实验偏倚，反而会加重它，因为这很容易让实验更偏向对照组，或者某个生物样本。

但是即便如此，Knight还是建议大家都应该设置实验对照，以便及时发现实验错误。Fuhrman还提到，他们最近就是因为设置了人工对照，所以才能够解释在实验中“丢失了”海水样品里整个微生物门的离奇事件。他表示，幸亏设置了实验对照，才能让他们在拿到那个奇怪的测序结果之后做出合理的解释。

支持还是反对

拿到数据之后，最终的任务是确定每个基因的序列，以及明确样品中都含有哪些微生物。但是和对16S研究工作存在争议一样，人们对于整个测序工作流程也还存在一些争议。传统的做法是，让计算机根据序列的相似

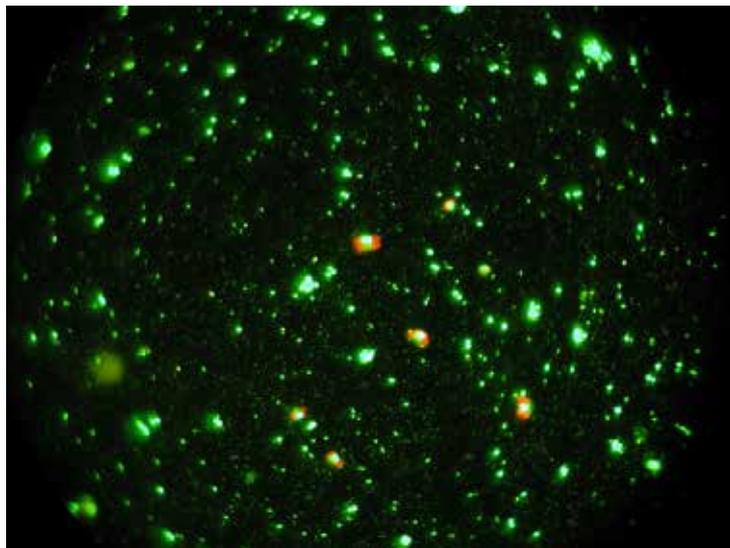
性，对每一个扩增子序列进行分类，看看都属于哪个操作分类单元（operational taxonomic units, OTU）。通常认为相似性大于97%就属于同一个OTU。科研人员可以使用这种方法，以较高的效率将核糖体序列组织起来，然后根

据现有的参考序列数据对这些核糖体序列进行查询、比对等，以判断整个检测样品中都含有（或不含有）某些微生物。不过，这种分类方法有时也会失效。据Gohl介绍，如果你的样品里有好几个待测物种，它们可能都属于一个种（genus），或者更高级的属，也就是很有可能都属于同一个OTU。如果出现了这种情况，就无法区分了。

还有一种办法是使用“扩增子序列变异（amplicon sequence variants, ASV）”，这种技术可以完全不需要计算机分类，而是科研人员自己对整个扩增子序列进行分析。从Fuhrman的角度来看，这种方法可以让他从16S数据中获取更多有用的信息；与OTU相比，也可以进行更大范围的数据比对。我们知道，OTU方法比较主观，而且不同的实验室之间，采用的分类策略也各有不同。Fuhrman表示，对他而言，就是要获得更多的数据。他表示，他们可以将非常高质量的数据进行整合，但是不可能分析质量非常差的数据。另一方面，这种方法可能会给需要从各种错误的测序结果中筛选出有价值的变异序列的科研人员，

以及需要对各种“奇怪”微生物基因组数据进行注释的科研人员带来很多麻烦。据Schloss介绍，比如，大肠杆菌的16S基因有7个拷贝，但是这些基因拷贝却不是完全一样的，所以你极有可能将大肠杆菌分成7个ASV。

这个因素还会影响定量研究。Fuhrman指出，在不同细菌的基因组里，16S编码基因的数量差异极大，少的才几个，多的有几十个，有些真核微生物甚至可以有数千个。使用软件可以起到一定的辅助作用，但是通常使用PCR扩增之后，就无法再进行定量了。不过还是可以提供非常有价值的、相对定量的信息。Schloss指出，根据对健康人群和结肠癌患者的研究结果，他们可以对受试者肠道标本进行检测，根据微生物组检测结果来判断其是否患有结肠癌。这依据的就是定量结果。Knight认为，只要弄清了偏倚的原因和表现，一致性（consistency）才是决定一个研究是否有科学意义的关键。如果你使用同样的方法来检测不同的样品，那么是否有偏倚就不那么重要了，因为你的目的只是比较不同的样品里是否含有同样的微生物。



根据16S数据进行的聚类，有助于科研人员对海水标本里的细菌、古细菌和原生生物（protists）进行区分。

偏倚的真相

很遗憾，不同的实验室之间并没有这种一致性，所以还是无法将不同实验室得到的数据合并起来，或者进行比较。Gohl表示，不同实验室之间的确存在非常大的差异，他们获取数据的流程也完全不同。而其中的技术噪声（technical noise）也已经达到了生物学变异这个程度。

鉴于此，目前出现了多个由多家科研机构共同参与的科研项目。旨在了解变异的来源，并建立可靠的实验流程，以提高一致性和可重复性，这其中就包括地球微生物组项目（Earth Microbiome Project, EMP）和微生物

物质控项目（Microbiome Quality Control project, MBQC）等。据作为EMP项目咨询委员会成员的Fuhrman介绍，EMP的最大作用就是让不同来源的数据可以进行比较。这个项目有将近300位科研人员参与，大家全都用同样的方法来分析数据。经过8年的工作，EMP项目已经建立起一整套有效的、用于分析16S rRNA的工作流程，尽管这还不是一套适用于所有实验的操作规范。实际上，在EMP项目开展之初，要求大家不论研究哪种样品，都必须用同样的DNA制备方法时，遭遇到了很大的阻力。这种统一的要求对于制定标准化流程很有帮助，但是在实际的科研工作当中，却往往需要做一些调整，才能得到更好的结果。

因此，也有人提出，从事微生物组研究的科研人员应该共享他们的实验流程和数据分析方法，以便形成有结构的元数据（metadata）。大多数科研人员都有责任上传他们的16S数据，比如上传到Sequence Read Archive等公共数据库当中，供所有人使用，不过这还远远不够。Quince就表示，从分享研究工作的角度来说，上传原始序列数据（raw sequences）其实没什么用处。你只有同时上传元数据，才可以进行荟萃分析，可惜的是，几乎没人这么干。现在还没人知道，应该如何使用胡萝卜和大棒，才能有效地刺激科研人员共享这些信息，但是Knight等人希望科研工作的标准化和透明化能够成为趋势和潮流。据他介绍，已经有一些科研人员开始遵循标准化的实验流程。这有助于我们后期将他们获得的实验数据进行整合，同时也有利于这些数据的重复利用。



Per Nielsen在丹麦海边采集海水和泥土标本，进行微生物组分析。



一名学生正在美国加州大学圣地亚哥分校微生物组创新中心（UCSD's Center for Microbiome Innovation）做实验。

虽然16S实验策略越来越强大，越来越可靠，但还是有一些科学问题无法用这个平台进行研究。比如，我们一直很难用16S信息在物种层面（species-level）去鉴定一个生物（organism），也很难通过16S信息获得微生物群落的功能特征（比如有哪些活化的代谢途径等）。对于这些问题，使用鸟枪基因组测序平台就更加合适，当然，现在有了读长更长的测序仪，鸟枪测序法也会慢慢被淘汰。Nielsen表示，随着科技的发展，用不了几年，我们不仅可以获得微生物16S基因的全长序列，还可以获得全基因组序列。这只是一个

时间早晚的问题。

16S分析技术还没有被取代，各个实验室如打算转换技术平台还需要周密考虑一下。Knight提醒，建立鸟枪测序实验流程的过程需要很大投入——花费了他们好几几年时间和数百万美元。因此我们需要根据研究目的来挑选合适的实验方法，很多时候，16S技术其实才是最合适的方案。Schloss也指出，每一种实验方法都有各自的偏倚，鸟枪法也不例外。如果你的研究目标是在微生物组样品里了解微生物群落层面的问题，那么虽然鸟枪法有偏倚，但是我们也没有更好的替代方案了。

原文检索：

Michael Eisenstein. (2018) Microbiology: making the best of PCR bias. *Nature Methods*, 15(5):317-320.

Eason/编译

高安全性 • 高滴度

AAVPrime™ 腺相关病毒颗粒

定制包装服务范围：ORF cDNA, shRNA, CRISPR sgRNA, SaCas9



产品优势

-  **高滴度**：纯化型 AAV 病毒滴度可达 10^{14} GC/ml (genome copies/ml)
-  **适用性广泛**：广泛适用于多种分裂及非分裂宿主细胞 / 组织
-  **低细胞毒性**：AAV 为非整合型病毒，不对宿主细胞基因组产生负面影响。
-  **生物安全级别高**：对人体无致病性
-  **低免疫原性**：进行活体实验时，实验动物免疫反应小

主要适用组织

血清型	视网膜	神经元	脑	肺	心脏	肝脏	肌肉	肾脏	胰腺
AAV-1		√			√		√		√
AAV-2	√	√	√			√	√	√	
AAV-3	√			√		√	√		
AAV-4	√	√	√				√		
AAV-5	√	√		√					
AAV-6				√	√	√	√		
AAV-7	√	√				√	√		√
AAV-8	√		√			√	√		
AAV-9			√	√	√	√	√	√	√
AAV-10		√		√	√	√	√		
AAV-DJ	广泛适用多种细胞的体外实验								
AAV-DJ/8	广泛适用活体实验，提高在非肝源细胞的感染效率								

AAV 对照 颗粒选择

GFP, IRES-GFP, LacZ, CRE, mCherry, FLuc, GLuc

AAV 克隆可选启动子

CMV, EF-1 α , CAG, CBh, CAMKII α , hSYN, MHC

AAVPrime™ 腺相关慢病毒颗粒

应用：可用于基因过表达，敲低，敲除的体内或体外实验

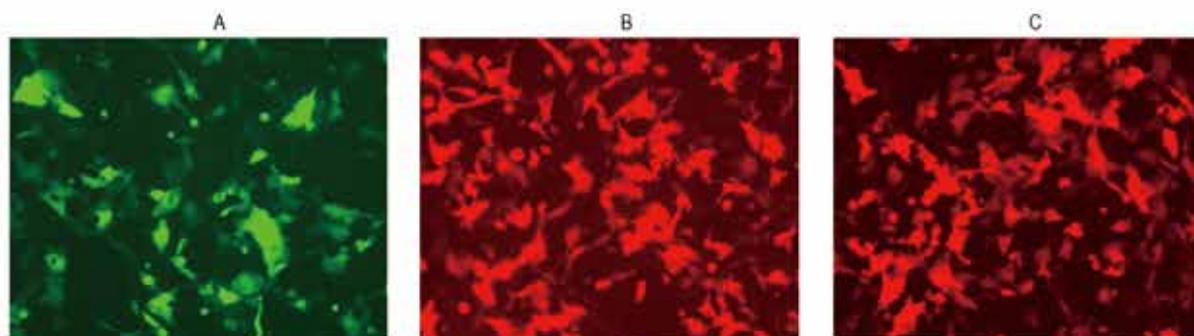


图 1. AAVPrime™ 预制 AAV 病毒（标准型）- 荧光报告基因表达。于 24 孔板中，使用 0.5 μ L 标准型 AAV 病毒感染 HT1080 细胞 (ATCC)，各 AAV 病毒分别表达 eGFP(A)、RFP(B)、mCherry(C)。感染后，使用荧光显微镜观察荧光蛋白表达情况。（曝光时间：400 ms）

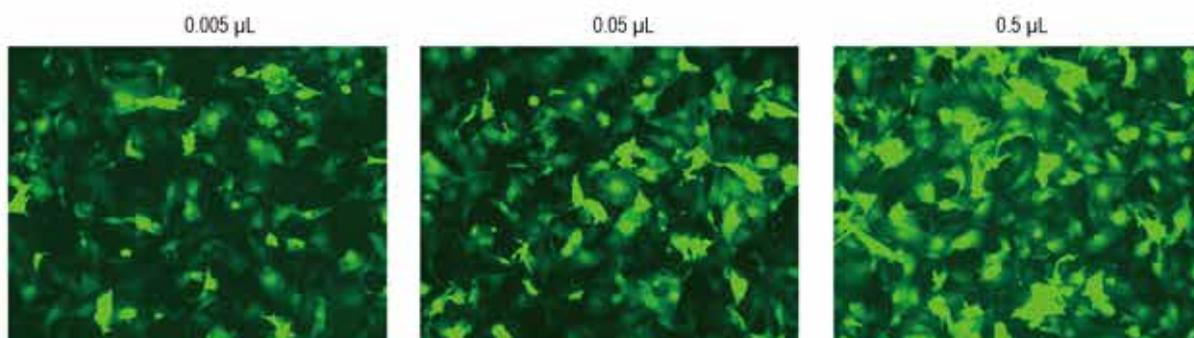


图 2. AAVPrime™ 预制 AAV 病毒（纯化型）- eGFP 表达。于 24 孔板中，使用上图所示用量的纯化型 AAV 病毒感染 HT1080 细胞 (ATCC) 表达绿色荧光蛋白 eGFP。感染后，使用荧光显微镜观察荧光蛋白表达情况。（曝光时间：400 ms）

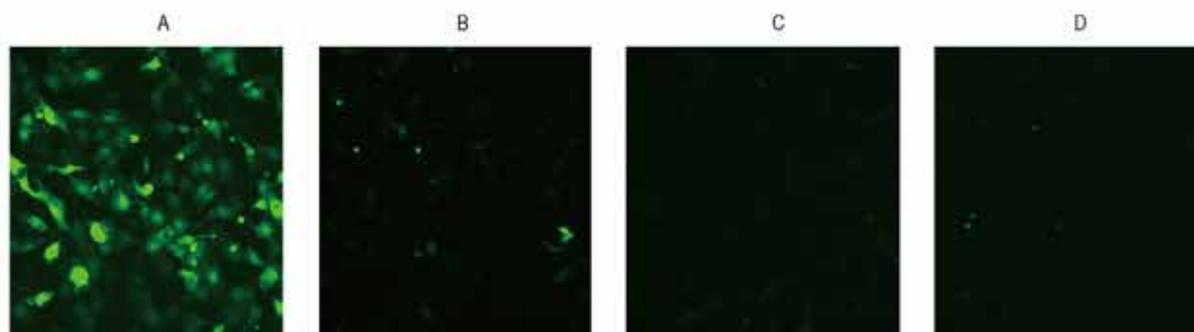


图 3. 于 24 孔板中，同时用标准型的表达绿色荧光蛋白 AAV（AAV-2-eGFP）和敲除绿色荧光蛋白的 AAV（AAV-2-shRNA）感染 HT1080 细胞 (ATCC)，选用不同的 MOI 值，3000:0(A)；3000:1500(B)；3000:3000(C) and 3000:6000(D)。感染 48 h 后用荧光显微镜观察荧光蛋白表达情况。（曝光时间：400 ms）



百态

蟒蛇的补脑神技



一条球蟒（ball python, *Python regius*）正在吃一只老鼠。

如果你生命中的大部分时间都在坐等一顿不知何时会出现的美餐施施然上门，那么，是不是很有必要削减掉某些无关紧要的事物，把能量集中在最重要的地方呢？对于球蟒（ball pythons）而言，这就意味着要削减几乎所有的消化系统和心脏容量。当它们的好运来临时，其体内各大器官的补充竞赛就迅速开始了，这才能充分利用美餐嘛！那么，结果如何呢？对此，美国加州州立理工大学（California Polytechnic State University, Cal. Poly.）的Christine Strand指出，此前，人们大多研究蟒蛇怎么将吃掉的东西迅速转化为增强心脏和消化器官的物质，却无人探究食物对其大脑有何影响。

那么，饱餐一顿的蟒蛇是否将摄入的食物迅速转化为新生脑细胞，并最终形成新的神经元呢？Strand、Stacy Habroun（现在美国加州大学圣迭戈分校，University of California San Diego）和Emily Taylor决定监控进食后的小蟒蛇的大脑。Strand承认，他们并不确定蟒蛇的大脑是否会对进食产生应答，并产生显著的细胞增殖。但是，可以推论，如果蟒蛇的大脑真的发生增殖反应，那么只有两个可能的时间点：一是在蛇消化食物的时候，此时其它器官的补充也会增强；二是消化完成之后，蛇的各个器官系统都拥有了充足的新鲜营养，此时它的余力将分摊给大脑。

Habroun和Strand确信，球蟒这种出了名的挑剔吃货肯定要吃很多鼠肉。于是，他们给了一组蟒蛇两天来消化美食，另一组则给予6天来进行完全的消化，随后从两组蛇的大脑中取样。在取样前1天，Habroun向蛇体内注射了一种只能被新生细胞吸收的示踪物质，期望揭示出：蛇在吃饱喝足之后，其大脑是否有生长情况？如果有，又在何时出现？之后，俩人与同样来自加州理工大学的Andrew Schaffner一道，对两组蟒蛇的大脑进行了比较。结果令人印象颇深。Strand表示，他们发现，与进食两天后的蟒蛇相比，进食6天后的蛇脑中存在大量的细胞增殖。这表明蟒蛇在努力消化食物之后（此时有能量可分摊），将能量投入到了

大脑的建设中。而当这种生长在整个大脑中进行时，某些能量会聚集于具备不同功能的特定区域（包括空间记忆、感觉信息处理以及饮食控制）。

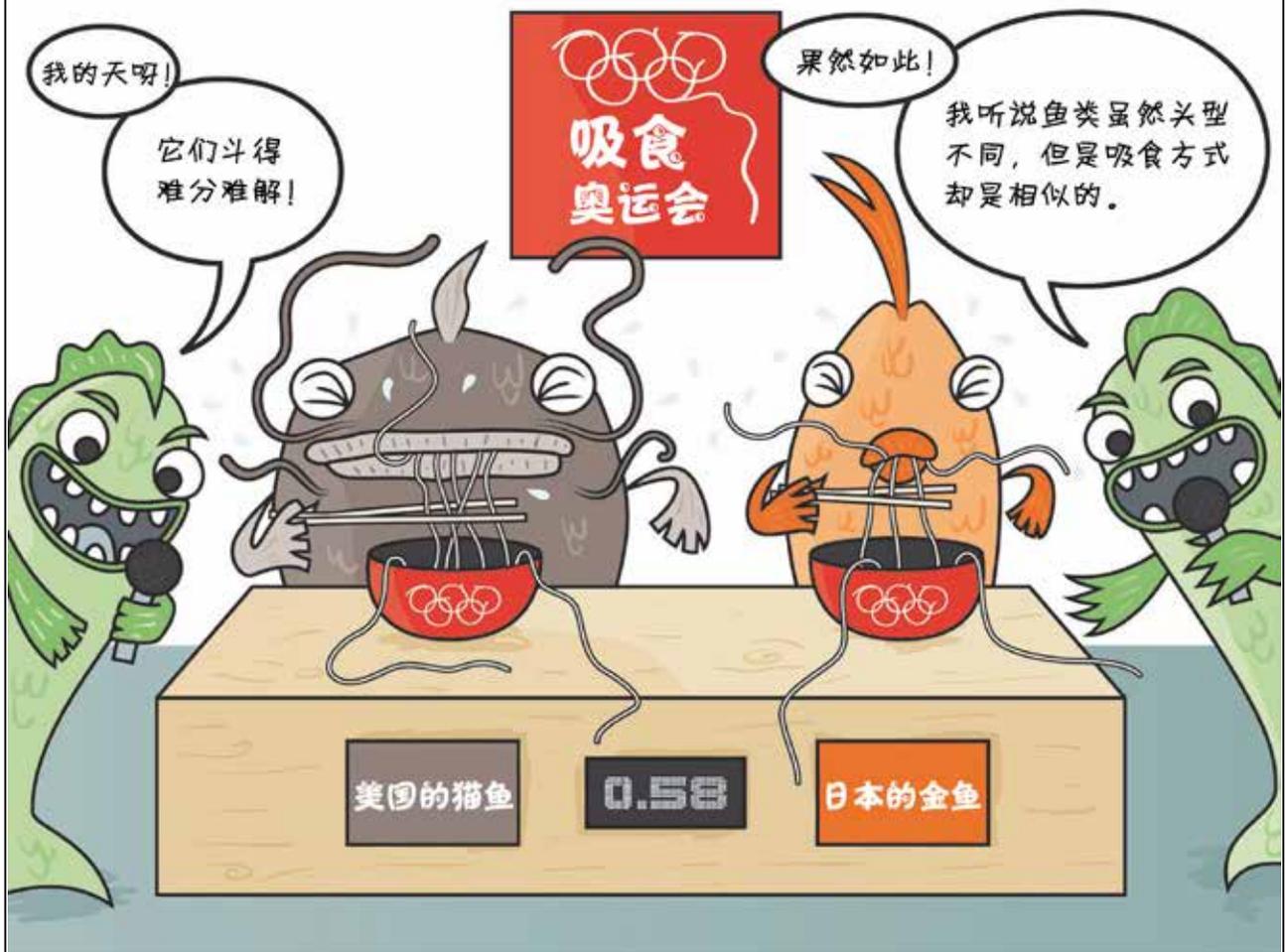
最后，Strand还想知道蛇脑中新生细胞的命运将会如何。她表示，他们将会观察新生细胞的存活情况，并追踪它们在大脑中的去向，以及是否会变成神经元。同时，Strand还猜测，营养充足的蟒蛇可能会抓紧机会从中获利。她表示，在这项研究中，受试蛇都是小蛇，仍处于生长期。因此，它们在进食后极有可能发生大脑新生细胞增殖的情况，毕竟此时，这些年轻的蟒蛇拥有适于生长发育的多余能量。

原文检索：

Habroun, S. S., Schaffner, A. A., Taylor, E. N. and Strand, C. R. (2018). Food consumption increases cell proliferation in the python brain. *J. Exp. Biol.* 221, doi:10.1242/jeb.173377.

文佳/编译

面相各异的鱼儿吸食方式相同



鱼类的头部形态各异, 饮食爱好也多种多样, 既有像蜗牛那样扁头的红耳鳞鳃太阳鱼 (redear sunfish), 也有以浮游生物为食

的美味的斑马鱼 (zebrafish), 还有大嘴美须的猫鱼 (catfish) 等等。但它们有一件事却是相同的: 进食的时候都用嘴吸。对此, 以

色列特拉维夫大学（University of Tel Aviv）的Corrine Jacobs和Roi Holzman表示，鱼在吃东西时，其嘴巴迅速张大吸水，同时将全部美味生物席卷入肚。但是，不同鱼类的吸食方式的变化程度如何，人们并不清楚。于是，两位科学家一块儿拍下了多种鱼类吸水时的场景，鱼的种类涉及图鱼（oscars）、小刀鱼（knifefish）、金鱼和脂鲤等，甚至还有两栖类（虎蝾螈，tiger salamander），以观察它们吸食的差异性有多大。结果令他们非常震惊：可变量非常小。

是的，不管鱼的嘴巴有多大，它们一次吸入的水量都不会超过能张开的最大一口，并且在嘴巴张得最大的瞬间，吸入量总会达到顶峰，而此时通常会产生最快的流入速度。因此，所有的鱼——以及可能包括其它吸食动物——都不是通过调整自己的吸入方式来适应食物的，而是使用几乎相同的方法吸食，哪怕它们的头部形态各异，多种多样。Jacobs 和 Holzman因此提出，鱼类吸食的可靠性或许使他们能进一步研究已进化为其它类型头部的动物吸入不同食物的方式。

原文检索：

Jacobs, C. N. and Holzman, R. (2018). Conserved spatio-temporal patterns of suction-feeding flows across aquatic vertebrates: a comparative flow visualization study. *J. Exp. Biol.* 221, doi:10.1242/jeb.174912.

文佳/编译

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky. The pyramid consists of four people standing on the ground, two people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The people are wearing dark jackets and light-colored pants. The sky is filled with soft, white clouds, and a bright sun is visible in the upper left corner, creating a lens flare effect. The overall scene conveys a sense of teamwork and achievement.

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