

## 热点专题综述

**陈林** 教授, 博士生导师, 长江学者特聘教授、国家杰出青年基金获得者, 入选“新世纪百千万人才工程”, 全军战创伤中心、创伤实验室、骨代谢与修复中心主任。《生物工程学报》第三、四届编委。先后任中华医学会重症医学委员会、中国病生学会重症医学委员会委员、全军重症医学委员会常委、中华医学会骨质疏松与骨矿盐疾病分会常委等。为 *JBMR*、*Bone Research*、《中华创伤杂志》(英文)、《第三军医大学学报》、《中华骨质疏松杂志》等杂志编委。主要从事骨骼发育(长高)、遗传疾病(侏儒等)、退行性疾病(骨质疏松、骨性关节炎、椎间盘退变)与修复、以及危重病器官损害的基础、临床研究。先后承担“973”计划、国家杰出青年基金、重大国际合作项目、国家自然科学基金重点项目(2项)、军队“十一五”重点、重庆市自然科学基金重大研究计划等课题。已发表文章100余篇, 其中SCI文章近40篇, 被SCI杂志引用2500余次。



## 遗传病的生物治疗

杨京, 谢杨丽, 陈林

第三军医大学大坪医院 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室骨代谢与修复中心 创伤实验室 康复理疗科, 重庆 400042

杨京, 谢杨丽, 陈林. 遗传病的生物治疗. 生物工程学报, 2015, 31(6): 968-975.

Yang J, Xie YL, Chen L. Biologic treatments for hereditary diseases. Chin J Biotech, 2015, 31(6): 968-975.

**摘要:** 遗传病尤其是单基因遗传病是儿童致畸致残的主要原因之一, 给家庭、社会带来沉重的经济、心理负担。目前绝大多数遗传病临床治疗以对症治疗为主, 尚缺乏有效的治疗方法。随着生命与医学科学的发展, 近年来以靶向致病分子或其相关信号通路、靶分子的外源物质补充、转基因、RNA 干扰、基因组编辑等生物学技术为代表的生物学治疗措施开始应用于遗传病的治疗, 并取得了一定的疗效。但目前大多数遗传病的生物学治疗仍局限于动物实验研究, 今后在继续研发基于致病机制的新治疗策略的同时, 将关注如何开展临床试验, 为最终安全、有效应用于临床患者奠定基础。

**关键词:** 单基因遗传病, RNA 干扰, 基因组编辑

**Received:** January 15, 2015; **Accepted:** March 2, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81220108020), the Fundamental and Frontier Research Project of Chongqing, China (No. CSTC2013jcyjC00009).

**Corresponding author:** Lin Chen. Tel/Fax: 86-23-68702991; E-mail: lincen70@163.com.

国家自然科学基金 (No. 81220108020), 重庆市基础与前沿研究计划项目 (No. CSTC2013jcyjC00009) 资助。

# Biologic treatments for hereditary diseases

Jing Yang, Yangli Xie, and Lin Chen

*Department of Rehabilitation and Physiotherapy, Trauma laboratory, Center of Bone Metabolism and Repair, State Key Laboratory of Trauma Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China*

**Abstract:** Hereditary disease, especially monogenic disease is one of the major causes for malformation and disability of children. Most hereditary diseases have no effective therapy besides clinical symptomatic treatment. Biological techniques targeting casual genes or related signaling genes, such as transgenic, RNA interfere, genome editing, have been successfully applied in treating some hereditary diseases. However, most biological treatments were carried out in animals, further confirmation of the effectiveness and safety of these therapies, and development of more therapeutic approaches based on mechanisms are needed before clinical trials.

**Keywords:** monogenic disease, RNAi, genome editing

遗传病的发病率虽然较肿瘤等常见疾病低，但常导致患者死亡或发生畸、残，影响正常生活和工作，给患者及家庭、社会带来了沉重的经济、心理、医疗负担。

绝大多数遗传病的临床治疗以对症处理为主，如针对骨骼畸形的手术矫形、针对凝血因子缺乏的补充治疗等，往往只能暂时缓解机体的部分异常功能。大部分表型不能被纠正，甚至可能会危及患者生命。随着生命医学科学的发展，更多的遗传病的致病基因被克隆、鉴定，相关分子致病机制得到更深入阐明，在此基础上 RNAi、基因组编辑技术、融合蛋白、多肽等直接靶向致病基因或其相关信号通路、分子的生物学技术被应用于遗传病的治疗并取得了一定的疗效。虽然这些研究大多局限于细胞、动物实验，但已有少数生物学治疗措施已经进入 I 期临床试验，这让我们看到了成功治愈遗传病的曙光。

## 1 遗传病概述

遗传病是指由于遗传物质发生改变所导致的一类疾病，主要有以下几类。

**染色体病：**由于整条或部分染色体增加、移位或缺失所致。多表现为生长迟缓、智力低下及各种身体异常。大多数染色体疾病发生在出生前，几乎占自然流产的 50%。

**多基因病：**由多个基因交互作用所致，可能某一些基因也起主要作用，但多为微效作用。环境因素也是多基因病的重要影响因素。如糖尿病、骨质疏松症、唇裂、一些先天性心脏病等。

**单基因病：**由单个基因突变所致。以常染色体及伴性的 X、Y 连锁方式遗传，有显性、隐性遗传之分。多于胚胎发育期、新生儿和幼儿阶段即发病。这也是本文介绍的主要类型。

**线粒体基因病：**不同于上述核基因组，是由于线粒体基因组发生突变所导致的一类疾病，呈

母系遗传。多为神经-肌肉系统病变, 如 Leber 遗传性视神经病、线粒体心肌病等。

## 2 遗传病的诊断

准确诊断遗传病是开展遗传咨询和防治工作的基础, 主要分为临床诊断和分子诊断。前者同普通疾病类似, 主要通过分析病史、症状、体征和辅助检查结果确立诊断, 也是目前临床中主要应用的方法。此外, 通过分析先证者家庭成员发病情况的系谱分析法有助于明确遗传病的遗传方式, 如是常染色体遗传病或性染色体遗传病; 也可区分表型相似的, 或由于遗传性而表现为不同遗传方式的遗传病。

染色体检查 (核型分析) 和性染色质检查是确诊染色体病的主要方法。分子诊断则是从遗传分子水平确诊单基因遗传病。随着分子生物学的进展, 对人类基因组的认识不断加深, 以及基因检测技术的飞速发展, 目前可利用特异性寡核苷酸探针杂交、PCR 相关技术、DNA 测序等基因分型技术检测 DNA 结构变化, 实时定量 PCR 法、基因芯片、蛋白芯片检测基因表达变化。对于已知致病基因者且明确该基因的序列和结构可直接检测突变。对于未知致病基因或未知突变情况者可通过对先证者及其家系进行连锁分析。

## 3 遗传病常规治疗

胚胎植入前遗传学诊断 (Preimplantation genetic diagnosis, PGD)、产前诊断等可预防遗传病胎儿出生, 也可因此让患儿在出生前得到手术、药物等治疗来缓解表型。目前对于出生后的遗传病患者临床治疗措施有限, 主要是预防或处理已经出现的异常表型以及对症治疗。

### 3.1 手术治疗

对于局限于某一器官的病灶可以手术切除。如家族性结肠腺瘤样息肉 (Familial adenomatous polyposis, FAP) 结合家族史, 早期行全结肠切除术可提高患者预后。脾切除可缓解球形红细胞增多症的溶血性贫血。

手术矫形可修复/改善病变器官畸形、恢复器官功能、提高患者的生活质量。如肢体延长术用于矫正软骨发育不全 (Achondroplasia, Ach) 患者的侏儒表型; 颅缝松解术可增加凶门早闭患者脑腔容积, 在一定程度上改善大脑发育及颅面畸形。

器官移植术加以抗免疫排斥反应治疗对于少数遗传病有较好的临床疗效, 如肾移植治疗家族性多囊肾、角膜移植治疗遗传性角膜萎缩症等。

### 3.2 药物治疗

#### 3.2.1 去除多余物质

利用药物可通过排泄堆积的代谢产物或抑制其生成治疗酶促反应异常的遗传病。如青酶胺螯合铜离子可防止 Wilson 病患者铜代谢障碍、铜离子沉积所致的肝硬化、肾功能损害等多种症状。

#### 3.2.2 替代、补充疗法

对一些遗传病, 主要是酶相关遗传病, 给予缺乏物质可以显著缓解表型或防止表型发生。如低磷酸酯酶症 (Hypophosphatasia), 其多为功能缺失型组织非特异性碱性磷酸酶 (Tissue-nonspecific isozyme of alkaline phosphatase, TNAP) 基因突变, 血清 ALP 活性降低, 患者骨矿化受损, 出现骨软化或佝偻病。骨靶向性的人重组组织非特异性 ALP 酶 ENB-0040 替代治疗可

明显缓解患者的上述异常骨表型,并改善胸廓变形所致的呼吸功能障碍<sup>[1]</sup>。需要注意的是替代、补充治疗通常需要终生服药。

### 3.2.3 对症治疗

针对遗传病出现的表型或并发症进行药物治疗,通常疗效有限。但也有一些对症治疗可以在一定程度上缓解部分遗传病表型。成骨不全(Osteogenesis imperfecta, OI)是一组临床脆性骨折和牙本质发育不全的结缔组织病,是儿童脆性骨折发生的主要病因。90%存在 *COL1A1*、*COL1A2* 基因突变所致的 I 型胶原蛋白结构及功能异常。传统临床干预手段主要是手术处理骨折,但其疗效不佳。近年来,有部分临床试验发现利用双膦酸盐(如帕米膦酸、奈利膦酸等)纠正其高骨转换(Bone turnover)可增加患儿骨密度并降低骨折风险<sup>[2]</sup>。

### 3.3 饮食疗法

限制特定营养物质摄入或吸收以减少代谢产物生成可治疗部分代谢性遗传病。如低苯丙氨酸饮食可防止苯丙酮尿症患者出现智力低下等症状。

## 4 遗传病的生物学治疗

### 4.1 针对致病基因

纠正突变的致病基因是治疗遗传病的根本。目前已有多种靶向致病基因或其相关信号通路、分子的生物学措施可应用于遗传病的治疗。

#### 4.1.1 靶向致病基因 DNA

基因组定向编辑技术是近年来的研究热点,目前已可在几乎所有物种中实现精确到核苷酸水平的定向修饰。通过引入正常的等位基因来纠

正突变的基因缺失、敲低突变等位基因 mRNA,基因组编辑为完全治愈遗传病带来了更大的可能性。

锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs)是最早研发出来的基因组定向编辑方法。其原理是利用锌指蛋白与核酸内切酶 *Fok I* 融合,不同的锌指 DNA 结合域集成 DNA 剪切区可定向特定 DNA 锌指结构域并激活内源性 DNA 修复。2005 年 Urnov 等首次在体外人体细胞中利用 ZFNs 纠正了 X 连锁重度联合免疫缺陷病(X-linked severe combined immune deficiency, SCID)突变的 *IL2R $\gamma$*  基因<sup>[3]</sup>。随后 ZFNs 也成功应用于动物模型,如有效纠正血友病 B 模型小鼠凝血时间延长<sup>[4]</sup>。转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)同样利用核酸内切酶 *Fok I* 剪切 DNA,靶向 DNA 的(Repeat variable diresidue, RVD)重复序列<sup>[5]</sup>。CRISPR/Cas9 利用 Cas9 靶向 CRISPR RNA (crRNA) 或导向 RNA (guide RNA, gRNA)<sup>[6]</sup>。与 ZFNs 相比较,TALENs 和 CRISPR 的靶向位点选择范围更广,效率更高。但 TALENs 有一定的细胞毒性,且构建复杂<sup>[7]</sup>。

上述 3 种基因组编辑技术均可激活细胞的两种 DNA 修复方式:非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(Homology-directed recombination, HDR),通过 4 种方式纠正 DNA 突变:破坏(Disruption)内源性序列、移码(Frameshift)恢复 DNA 读码框、敲入(Knock-in)外源性序列和置换(Substitution)突变序列<sup>[7]</sup>。目前上述基因组编辑技术绝大多数只是在人体细胞或动物实验中证实有效<sup>[8-9]</sup>,如何应用于临床还存在较多实际问

题,如可能出现脱靶效应 (Off-target) 诱导肿瘤发生等。

#### 4.1.2 靶向致病基因 RNA

对于功能增强型突变所致遗传病还可利用 RNAi 技术干预致病基因的 RNA 转录、降解。RNAi 是双链 RNA 介导的转录后基因沉默。成纤维生长因子 2 (Fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2) 功能增强型点突变是 Apert 综合征的主要病因。Shukla 等发现利用 RNAi 降低 FGFR2 表达水平可完全防止 Apert 小鼠出现囟门早闭表型<sup>[10]</sup>。

根据 Clinical Trial 数据库,目前有 23 项注册临床研究使用 RNAi 方法治疗肿瘤、HIV、肝炎等疾病,尚无应用于遗传病治疗的临床试验。限制 RNAi 技术应用于临床治疗的因素主要包括稳定性、off-target 效应、免疫刺激以及导入机体方法。以往多使用胆固醇或脂质体使 SiRNA 非选择性导入体内,仅对于靶器官是肝脏或空肠者有较好的效果,且需要的药物剂量较大,存在明显脱靶效应<sup>[11]</sup>。随着 RNAi 导入技术的改良,首项 RNAi I 期临床试验采用纳米粒释放系统 (Nanoparticle-delivery system) 递送 RNAi 来治疗实体瘤。近来脂质纳米体 (Lipid Nanoparticles, LNPs) 实现了 RNAi 的多种细胞靶向性。以上技术的发展为 RNAi 应用于遗传病临床治疗奠定了基础。

#### 4.1.3 靶向致病基因编码蛋白

对于功能增强型突变所致遗传病,尤其是受体蛋白突变疾病,可利用可溶性蛋白、模拟多肽等阻断突变蛋白发挥效应。以 FGFRs 功能增强突变所致骨骼遗传疾病为例,可通过阻断跨膜受体 (FGFRs) 与配体 (FGFs) 结合来抑制致病蛋

白发挥作用。Ach 和致死性侏儒 (Thanatophoric dysplasia, TD) 均主要由 FGFR3 功能增强型点突变所致<sup>[12]</sup>。我们利用酵母杂交筛选到结合 FGFR3 胞外域的 12 多肽 (P3),可缓解致死性侏儒小鼠 (TD II) 的异常表型<sup>[13]</sup>。FGFR3 可溶性受体、FGFR2 融合蛋白可分别缓解 Ach<sup>[14]</sup>和 Apert 小鼠表型<sup>[15]</sup>。

#### 4.1.4 靶向相关信号通路/分子

根据遗传病的发病机制,利用阻断剂直接阻断功能增强型遗传病中调高的信号通路有一定疗效。MAPK 磷酸化增加是 FGFR2 点突变导致 Apert 发生的主要机制,Shukla 等发现注射 U0126 阻断 MEK 磷酸化<sup>[10]</sup>可部分缓解 Apert 小鼠颅缝早闭表型。除了直接阻断相关信号通路,利用其他分子来间接调节疾病发生相关信号通路是另外一个策略。Lorget 等在软骨细胞中过表达 C 型利钠肽 (CNP) 及给予 CNP 注射可缓解 Ach 小鼠表型,其机制是 CNP 通过抑制 MAPK 通路促进细胞外基质生成。由于 CNP 半衰期过短,该团队开发了其多肽类似物 BMN111 以治疗 Ach,目前已进入 II 期临床试验<sup>[16]</sup>。

另外,还可通过调节疾病发生中非致病基因直接调控的信号通路治疗遗传病。如 Grafe 在 OI 基因工程小鼠模型中发现 TGF- $\beta$  信号通路过度激活是其发病的重要原因,利用 TGF- $\beta$  的中和抗体 1D11 可部分纠正 OI 小鼠的异常骨骼表型并改善其肺脏病理形态。该抗体将于 2015 年开始进行 I 期临床试验<sup>[17]</sup>。

## 4.2 针对表型

尽管靶向致病基因的研究给临床治愈遗传病带来了曙光,但也必须认识到基因型并不能始终如一地预测表型<sup>[18]</sup>。因此,对于这部分遗传病

最直接的治疗策略就是针对患者及其表型进行干预。如 *COL1* 基因突变是 OI 患者频发骨折的根本原因,但目前尚缺乏直接靶向 *COL1* 基因的治疗手段,因此可直接通过改善骨质量以预防骨折。以往发现低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LDL receptor-related protein 5, LRP5) 介导经典 Wnt 通路促进间充质细胞向成骨细胞分化并增加骨密度<sup>[19]</sup>。Jacobsen 等在 OI 转基因模型小鼠中过表达 LRP5 可不依赖于影响 *COL1* mRNA 表达或蛋白分泌来增加小鼠骨量和骨强度<sup>[20]</sup>。此外,给予 OI 小鼠 LRP5 的抑制分子——clerostin 的单克隆抗体可增加小鼠骨密度及骨力学强度,达到治疗目的<sup>[20]</sup>。

### 4.3 其他

除了上述基因相关的生物学治疗措施外,干细胞一直是各种疾病治疗措施研究的热点和难点,也已经在遗传病治疗方面开始启动研究。尤其是多能干细胞 (iPS),从成体分离的具有自我更新和多向分化潜能的干细胞,可解决异体移植干细胞的伦理和安全性问题。已有研究利用 TALENs 在 iPS 中修饰凝血因子 VIII 基因 (Blood coagulation factor VIII, F8) 制备了模拟血友病 A 的细胞系,同时再利用 TALENs 成功地在该细胞系中恢复 F8 正常表达<sup>[21]</sup>。Sasai 团队利用三维培养系统成功地将人 ES 细胞诱导成大脑皮层组织和包含视网膜和感光细胞的胚胎眼睛<sup>[22]</sup>。以上研究都为干细胞应用于遗传病的治疗提供了可行性。

## 5 展望

### 5.1 致病机制的研究是治疗遗传病的基础

随着高通量测序技术的发展,外显子测序、生物信息学等新策略、新技术的应用,越来越多

的遗传病致病基因被克隆鉴定。通过临床患者结合模式动物的研究,分子机制也得到了深入阐释,为生物学治疗提供了更明确的靶点。如前文提及的 Ach,既往发现其主要的致病基因是 *FGFR3*。我们首先建立了模拟人 Ach 的转基因小鼠模型 (G369C),进而发现其病变的主要机制是 *FGFR3* 通过激活 MAPK 和 STAT1 通路抑制软骨细胞增殖及分化<sup>[23]</sup>。在此基础上,orget 等利用 CNP 多肽类似物抑制 MAPK 能有效缓解 Ach 小鼠表型<sup>[16]</sup>。

### 5.2 生物治疗的时空靶向性和安全性是保证临床应用的关键

**时间靶向性:**治疗疗程需要根据表型出现的时间进行确定。对机体生理功能存在持续影响的疾病应长期干预,如低磷酸酯酶症患者需终生补充缺乏的碱性磷酸酶,长期用药的安全性尤其重要。胎儿期或儿童期发病者应在个体发育的相应阶段进行干预,如 ACH 患者主要是骨骼发育的异常,成年期无更多的表型出现,应在骨骼发育的早期干预。

**空间靶向性:**遗传病发生病变的组织/器官由致病基因的表达部位决定,靶向特定的病变细胞、纠正其异常功能,而不影响其他正常组织/器官功能可提高生物学治疗措施的有效性及其安全性。如既往 RNAi 导入机体主要利用腺病毒或慢病毒载体,缺乏特异性和靶向性。脂质纳米体解决了 RNAi 的细胞靶向性,目前已实现多种细胞靶向,如实质肿瘤、呼吸道上皮细胞、部分吞噬细胞。靶向成骨细胞的 antagomir-214 (靶向 ATF RNAi) 可促进小鼠骨形成<sup>[24]</sup>。这也为其他生物治疗措施如何实现细胞靶向性提供了借鉴。此外,在干预手段的选择方面,直接靶向致病基

因/蛋白的治疗措施,其理论上比通过靶向致病基因相关信号通路/靶基因来间接调节致病基因/蛋白的副作用更小。

安全性:基因组编辑技术的 off-target 现象是其最主要的安全问题,其使用的核酸酶可能激活原癌基因或破坏肿瘤抑制基因、最终导致肿瘤发生。另外,导入蛋白的免疫反应也是临床应用生物技术需要注意的副作用,必要时应考虑同时使用免疫抑制剂。

### 5.3 强调综合治疗

虽然一些遗传病的生物学治疗措施得到了较大的发展,但必须清醒地认识到目前这些生物学治疗方法仍不能完全治愈遗传病,对于已经发生的异常表型、并发症,仍需要结合临床进行相应的药物、手术或康复治疗。

综上所述,基因组编辑、RNAi、融合蛋白、可溶性受体、模拟短肽等生物学方法,以靶向遗传病致病基因 DNA、RNA、编码蛋白及相关信号通路/分子等为策略,给遗传病的临床治疗提供了新的选择。虽然这些治疗措施大多数仍局限于体外或动物实验,存在时空靶向性、安全性等需要进一步完善的缺陷,但随着生命医学科学的发展,不久的将来生物学治疗措施必将成功应用于临床上,治愈遗传病成为可以预想的现实。

## REFERENCES

- [1] Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, et al. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med*, 2012, 366: 904–913.
- [2] Bachrach LK, Ward LM. Clinical review: bisphosphonate use in childhood osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(2): 400–409.
- [3] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646–651.
- [4] Li H, Haurigot V, Doyon Y, et al. *In vivo* genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 2011, 475(7355): 217–221.
- [5] Service RF. Scientific integrity. A dark tale behind two retractions. *Science*, 2009, 326(5960): 1610–1611.
- [6] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [7] Li HL, Nakano T, Hotta A. Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 63–77.
- [8] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med*, 2013, 19(9): 1111–1113.
- [9] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 2013, 3: 2510.
- [10] Shukla V, Coumoul X, Wang RH, et al. RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat Genet*, 2007, 39(9): 1145–1150.
- [11] Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, 432(7014): 173–178.
- [12] Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 1994, 78(2): 335–342.
- [13] Jin M, Yu Y, Qi HB, et al. A novel FGFR3-binding peptide inhibits FGFR3 signaling and reverses the lethal phenotype of mice mimicking human thanatophoric dysplasia. *Hum Mol Genet*, 2012,

- 21(26): 5443–5455.
- [14] Garcia S, Dirat B, Tognacci T, et al. Postnatal soluble FGFR3 therapy rescues achondroplasia symptoms and restores bone growth in mice. *Sci Transl Med*, 2013, 5(203): 203ra124.
- [15] Morita J, Nakamura M, Kobayashi Y, et al. Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the apert mouse model. *Dev Dyn*, 2014, 243(4): 560–567.
- [16] Lorget F, Kaci N, Peng J, et al. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a *Fgfr3* mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet*, 2012, 91(6): 1108–1114.
- [17] Grafe I. Excessive transforming growth factor- $\beta$  signaling is a common mechanism in osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 2014, 20(6): 673–675.
- [18] Scriver CR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr*, 2002, 140(5): 502–506.
- [19] Gong YQ, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 2001, 107(4): 513–523.
- [20] Jacobsen CM, Barber LA, Ayturk UM, et al. Targeting the LRP5 pathway improves bone properties in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(10): 2297–2306.
- [21] Park CY, Kim J, Kweon J, et al. Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(25): 9253–9258.
- [22] Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(50): 20284–20289.
- [23] Chen L, Adar R, Yang X, et al. Gly369Cys mutation in mouse *FGFR3* causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest*, 1999, 104(11): 1517–1525.
- [24] Wang XG, Guo BS, Li Q, et al. miR-214 targets *ATF4* to inhibit bone formation. *Nat Med*, 2013, 19(1): 93–100.

(本文责编 郝丽芳)