

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-059

合成生物学在疾病诊疗中的应用

吴晓昊¹, 廖荣东², 李飞云¹, 欧阳中天¹, 冉怡¹, 公维远¹, 曲明灏¹, 陈明珏¹, 林荔军², 肖国芝¹
(¹ 南方科技大学医学院, 广东 深圳 518055; ² 南方医科大学珠江医院关节骨病外科, 广东 广州 510280)

摘要: 合成生物学是一门新兴学科。从广义上讲, 合成生物学是通过将基因工程、系统生物学、计算机工程等多学科作为工具, 根据特定需求进行设计, 乃至重新合成生物体系。近20年来, 合成生物学领域的相关研究不断取得突破, 并已在针对人类疾病的诊断、临床治疗、药物研发等诸多方面获得重要应用。合成生物学不仅为疾病的早期、精确诊断提供新的思路和技术手段, 还发展出多种新型的疾病治疗手段, 包括基于合成生物学原理设计的细胞疗法、细菌疗法、疫苗、生物医学材料等。利用合成生物学方法, 我们可以精确诊断早期疾病、精准改造细胞或细菌、进行疾病机制研究和药物筛选、快速生产新型疫苗和生物医学材料。基于合成生物学的疾病诊疗方法将是科研领域重要的发展方向之一, 并将在未来彻底改变临床疾病的诊疗方式。本文综述合成生物学原理和技术在疾病诊断和治疗中的应用, 并进一步探讨合成生物学在疫苗生产、生物医学材料、新药研发等方面的应用。

关键词: 合成生物学; 疾病; 诊断; 治疗; 新药研发

中图分类号: Q81; R318 **文献标志码:** A

Applications of synthetic biology in disease diagnosis and treatment

WU Xiaohao¹, LIAO Rongdong², LI Feiyun¹, OUYANG Zhongtian¹, RAN Yi¹, GONG Weiyuan¹,
QU Minghao¹, CHEN Mingjue¹, LIN Lijun², XIAO Guozhi¹

(¹ School of Medicine, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, Guangdong, China; ² Department of Orthopedics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong, China)

Abstract: Synthetic biology (SB) is an emerging discipline, which utilizes genetic engineering, systems biology, computer science, and other disciplines as tools to design, and even re-synthesize biological systems for specific needs. In the past 20 years, milestone breakthroughs in SB have been achieved and applied in the diagnosis and treatment of human diseases, particularly in the discovery of new drugs. SB not only provides new ideas and technical tools for the early and accurate diagnosis of diseases, but also develops a variety of new approaches for treating diseases, including cell therapy, bacteriotherapy, vaccines, and biomedical materials. Using SB-based methods, we can precisely diagnose diseases at an early stage, specifically engineer cells or bacteria, conduct mechanistic studies and drug screening, and

收稿日期: 2022-10-31 修回日期: 2023-02-01

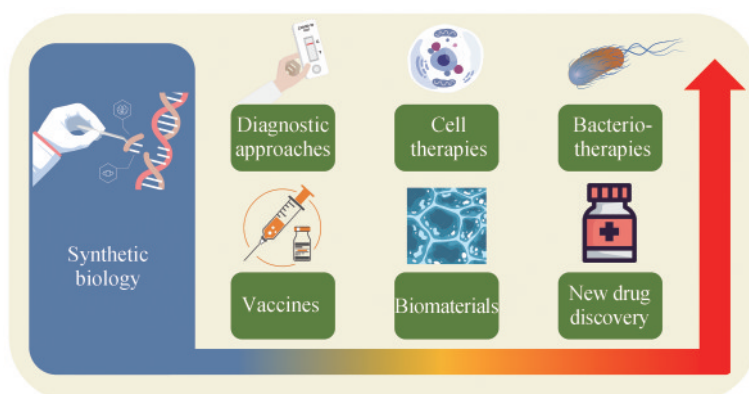
基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0906004); 国家自然科学基金(82230081, 82250710175, 82172375, 81991513, 81630066, 81870532)

引用本文: 吴晓昊, 廖荣东, 李飞云, 欧阳中天, 冉怡, 公维远, 曲明灏, 陈明珏, 林荔军, 肖国芝. 合成生物学在疾病诊疗中的应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(2): 244-262

Citation: WU Xiaohao, LIAO Rongdong, LI Feiyun, OUYANG Zhongtian, RAN Yi, GONG Weiyuan, QU Minghao, CHEN Mingjue, LIN Lijun, XIAO Guozhi.

Applications of synthetic biology in disease diagnosis and treatment[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(2): 244-262

rapidly produce vaccines and biomedical materials. SB with the “design-build-test” cycle greatly facilitates the development of new diagnostic and therapeutic approaches. Moreover, SB applies engineering principles (modularity, composability, abstraction, and standardization) to redefine biological systems in a more modular and composable way. Through this framework, the basic units of the biological system are fully characterized as standardized motifs (DNA sequences or gene-encoded products), and these motifs are mixed and matched to construct a fully functional genetic apparatus. By utilizing recently developed gene editing tools, such as the clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR/Cas9) technology, SB can integrate programmed devices into a chassis (*e.g.*, bacteria and yeast), create new systems capable of producing target biomolecules or behaviors, and precisely manipulate the genome of cells and individuals to repair genetic defects. SB-based disease diagnosis and treatment will be one of the important development directions in the field of scientific research to completely change the way of diagnosis and clinical treatment of diseases in the future. This article reviews the applications of SB-based technologies in disease diagnosis and treatment, as well as in the production of vaccines and biomedical materials, as well as in new drug development.



Keywords: synthetic biology; disease; diagnosis; treatment; drug development

合成生物学是一门新兴学科。从广义上讲，合成生物学是通过将基因工程、系统生物学、计算机工程等多学科作为工具，根据特定需求进行设计，乃至合成生物体系^[1]。2000年，《Science》报道了两个人工合成的基因网络震荡器（oscillator）和基因开关（toggles witch）^[2-3]，正式开启了合成生物学研究的重要分支——基因回路。随后，学界进一步设计出了布尔逻辑门（Boolean logic gates）和反馈控制器（feedback controllers）等基因回路^[4-5]。近20年来，合成生物学领域的相关研究不断取得突破，并已在人类疾病的临床诊断和治疗中获得应用。

疾病的发生发展往往伴随着某些分子代谢产物的异常表达。基因回路基本原理是以细胞作为传感器检测异常分子信号，对其进行处理，并以一种可编程和可预测的方式产生相应的调节或治

疗效应^[6]。常用的调控方式是类似电器元件里的“开关”与“逻辑门”。“开关”是能起到特异性识别作用的分子结构，可由此激活（“开”）或抑制（“关”）下游效应物功能，常见类型如核糖开关、RNA开关；“逻辑门”则是对单个或多个输入的生物分子信号进行单次或叠加逻辑运算，以输出效应物，包括“与门”“或门”“与非门”等等^[7-9]。例如，Kemmer等通过“与门”设计了一种基因回路来调节体内尿酸稳态。这种基因回路可在高尿酸刺激的条件下，通过表达尿酸氧化酶来降低尿酸水平。进一步试验将基因回路装置植入尿酸氧化酶缺陷的转基因小鼠体内后，发现尿酸浓度明显降低且肾脏中的尿酸晶体沉积也明显下降^[10]。嵌合抗原受体（chimeric antigen receptors, CAR）T细胞是一种通过基因编辑表达跨膜嵌合抗原受体并具有特异性导向的T细胞，在肿瘤免疫治

疗方向中占有重要地位,而将其与“逻辑门”结合用于肿瘤治疗也是研究的方向之一。Rebecca等^[11]设计一种“非门”结合CAR-T细胞用于治疗急性髓系白血病,CD93在人内皮细胞上较高表达,而该“非门”CD93 CAR-T细胞能够靶向治疗急性髓系白血病而对内皮细胞仅产生极低的毒性作用,并且不会损害造血干/祖细胞^[11]。

合成生物学是一个致力于设计生物学以执行用户定义的功能的领域,其促进了对生命实体和/或其产品进行编程的系统方法,促进了快速、廉价、可获得但复杂的产品开发。合成生物学带来了更先进的克隆技术,如新的体外重组系统。这极大地简化了从组成部分构建大分子DNA的过程,大大缩短了“设计-建造-测试”的周期^[12-13]。合成生物学借鉴了工程学的概念并将其应用于生物学。实际上,复杂系统由执行同步功能的高度互联的实体组成。然而,合成生物学应用工程原理(模块化、可组合性、抽象性和标准化)将它们重新定义为模块化和可组合的方式。通过这一框架,系统的基本单位是一个完全特性和标准化的基序(DNA序列或基因编码产物)。这些基序被混合匹配,以构建功能齐全的遗传装置。将设定好的装置集成到底盘(例如细菌、细胞)中,就构建出了一个能够产生目标生物分子或行为的新系统^[14-16]。

基因编辑技术可以精准地改变动物细胞的DNA,弥补基因缺陷,因此其在遗传性疾病治疗、肿瘤治疗、疾病相关基因筛查与检测等领域有着巨大潜力。成簇有规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced palindromic repeats, CRISPR/Cas9),最早由日本分子生物学家Yoshizumi Ishino^[17]于1987年在大肠杆菌中发现。随着研究的不断深入,目前已确定它是细菌和古细菌在长期演化过程中而形成的适应性免疫防御机制,用以对抗外源入侵的核酸。2013年,基于CRISPR/Cas9的基因编辑技术成功在哺乳动物中实现基因编辑,标志着其成为第三代基因编辑技术。CRISPR/Cas9的优势在于几乎可以靶向任何基因,且操作较前代更简便、敲除效率更高,目前已经广泛用于修复致病突变、疾病机制研究等领域^[18-21]。CRISPR/Cas9基因编辑技术的基本原

理是通过Cas9蛋白在特定位置切断双链DNA,随后细胞内开始进行DNA双链修复,从而改变部分基因序列,利用这个过程进行基因的靶向改造^[17]。DNA修复又有非同源性末端接合(non-homologous end joining)和同源定向修复(homology-directed repair)两种机制,后者更适用于条件性基因敲除、基因敲入和点突变等。CRISPR/Cas9基因编辑技术的发展为合成生物学在人类疾病研究中的应用提供了重要基础。

合成生物学的兴起为人类疾病的诊断和治疗提供新的思路和技术手段。本文综述合成生物学原理和技术在疾病诊断和治疗中应用,并进一步探讨合成生物学在疫苗生产、医学材料、药物开发等方面的应用。

1 合成生物学与疾病诊断

疾病的精确诊断对后续的临床治疗至关重要。诊断技术发展的共同目标是提高临床诊断性能,如增加定量的敏感性、特异性和准确性,以及改进化验特性,如缩短得到结果的时间、降低成本、提高可移植性、简化工作流程等^[22-23]。传统的非侵入性诊断方法准确性和敏感性较低,而侵入式检测方式耗时长、成本高。合成生物学作为一种新兴技术,在疾病诊断方面有着很大优势。它能够利用合成生物学方法特异性地放大患者体内的疾病信号,从而进行疾病的精准诊断^[24]。目前这种技术主要应用在两个方面:一方面是癌症等非传染性疾病的诊断,另一方面是传染性疾病的诊断,比如埃博拉出血热、艾滋病等。

1.1 合成生物学在癌症诊断中的应用

现有临床干预措施在癌症的早期阶段成功率最高^[25]。因此,在临床症状出现之前检测浸润前肿瘤可增强医疗干预的效果,从而治愈大多数尚未转移的局部癌症^[26]。但是癌症的早期症状轻微,且生化标志信号强度很低,传统的诊断方法需要灵敏度很高的测试,这会占用大量医疗资源^[27]。生物标志物的表达或释放是可变的,并因肿瘤异质性、合并症和健康细胞的背景分泌而复杂化^[28]。

合成生物学应用于癌症等非传染性疾病的诊断主要利用生物传感器来检测早期肿瘤或其前体的失调特征产生放大的信号，这些外源性传感器利用肿瘤依赖性激活机制（例如酶放大）来驱动合成生物标志物的产生和信号放大（表1）。也可以通过针对合成生物标志物基本特征的成像系统来检测癌症，在确认可检测的合成生物标志物信号后，成像还将在检测肿瘤的具体位置方面发挥重要作用^[29]。合成生物标志物主要有两个策略：一是基于生物活性的合成生物标志物；二是基于基因编码的合成生物标志物。

与生物活性相关的标志物和其他探针类似，主要针对已知的人类生理特征或已确定的疾病机制，使用生物惰性探针产生通常在体内不存在的信号，从而最大限度地提高信噪比。基于活性的合成生物标志物还包括由肿瘤或其微环境中的酶激活的传感器组件，以提供肿瘤生物标志物分子扩增的机制^[29]。人类基因组编码超过550种蛋白酶^[30]，其中基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMPs）在绝大多数癌症类型中过度表达^[31]。它们的关键功能之一是在血管生成“转换”期间调节血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）的生物利用度，这一过程发生在肿瘤新时期，可使肿瘤更多地获取血液营养物质以加速扩散^[32]。最近的研究表明，失调的MMPs表达可用于预测癌症分类^[33]。MMPs激活的合成生物标志物包含与惰性载体表面缀合的肽底物，后者在被肿瘤MMPs酶切后将报告物释放到血液或尿液中以供检测^[34]。因此，MMPs是特别有效的生物信号放大器，因为肽键的水解是不可逆的，并且MMPs在肽分解过程中不会被消耗，从而使单个拷贝转化为数千个底物^[35]。

基因编码合成生物标志物的另一个主要策略，

是使用工程化的组件或细胞来放大合成生物标志物的释放。这些方法侧重于驱动肿瘤微环境中的常驻细胞或浸润细胞产生或分泌报告基因^[36-37]。这些方法的主要优点是能够将合成生物标志物靶向转录至特定表型的细胞，从而减少潜在的由健康组织中的背景信号引起的假阳性^[37]。用于生产合成生物标志物的基因编码系统主要有三类，即基于载体、基于哺乳动物细胞和基于细菌细胞的系统。基于基因载体进行转录靶向是限制靶组织中转基因表达的有效方法^[29]。在此基础上，基于载体的系统依赖于两个关键设计组件：驱动转录的组织选择性或癌症选择性启动子；分泌到血液或尿液中进行检测的合成生物标志物^[38]。细胞作为诊断载体的一个明显优势是特定细胞能够归巢并浸润癌症部位，而分子探针则较为依赖于从脉管系统被动扩散到肿瘤组织中积累^[39]。间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSC）是具有再生和免疫调节特性的多能干细胞。系统性注入的MSC会选择性地归巢于原发性和转移性肿瘤^[39]。某些类型的细菌在肿瘤中浸润并选择性生长，这归因于免疫监视受到抑制和实体瘤核心内坏死细胞释放营养物质水平的增加^[40]。这促使人们使用工程化的肿瘤靶向细菌作为癌症检测和诊断的可编程载体。

1.2 合成生物学在传染病诊断中的应用

在低收入国家，传染病造成的死亡超过了所有其他病因，并构成全球健康风险，给医疗系统和社会带来巨大压力。解决这一危机的方法之一是对传染病进行早期诊断，这是优化治疗、提高患者存活率和降低医疗成本的有效方法^[41]。然而，传统的早期诊断方法需要较长时间才能产生结果，缺乏准确性，并且在诊断真菌和病毒感染时表现不佳^[42]。合

表1 合成生物学在癌症诊断中的生物传感器特点

Table 1 Biosensors developed through synthetic biology for cancer diagnosis

项目	酶传感器	质粒传感器	哺乳动物细胞传感器	细菌传感器
原始信号	酶活性失调	转录活性改变	转录或代谢活性改变	生化特性改变(如营养物质, pH等)
放大方式	催化放大 尿液浓缩	分泌物增加	细胞增殖 分泌物增加	细菌增殖 催化放大 尿液浓缩
信号特征	底物信号扩大	特异性转录	肿瘤微环境驱动信号激活	特异性肿瘤靶向浸润
检测方式	尿液, 血液, 呼吸	尿液, 血液	尿液, 血液	尿液, 血液

成生物学为传统传染病诊断提供了一种快速且高度准确的替代方法。与常用的抗体诊断平台相比，基于合成生物学的诊断方法从设计到生产的周期更短，使我们未来能够轻松应对迅速出现的病原体。

噬菌体是感染细菌的病毒，能够识别和渗透特定的细菌靶标。利用宿主特异性，噬菌体或噬菌体衍生识别蛋白的组合可用于识别一系列病原体并对宿主遗传性质进行检测^[43]。生物传感器是使用由分离的酶、免疫系统、组织、细胞器或整个细胞介导的特定生化反应来检测化合物的设备^[44]。当其与新技术相结合时，例如纸质流体设备、动态生物材料等，生物传感器系统非常适合作为便携式即时诊断工具^[44]。全细胞生物传感器是对目标化学物质有反应的全工程细菌细胞、酵母或哺乳动物细胞，通常包含一种以某种配体为目标的传感器蛋白，并与基因调控系统相结合，以产生可测量的宿主细胞信号^[45]。无细胞生物传感器包含基因表达所需的所有基质和细胞成分^[46]。一类被称为 Toehold 开关的工程 RNA 特别适合作为特定核酸的生物医学诊断。这些开关可以与无细胞表达系统相结合，创建高度便携的纸质核酸诊断^[47]。Toehold 开关是一种原核生物核糖体调节器，可检测任意核酸的存在，并通过驱动蛋白质表达作出响应。在没有触发核酸的情况下，其结构能通过限制翻译起始而保持关闭状态。当存在触发核酸时，Toehold 开关使核糖体结合位点和起始密码子暴露出来并启动报告基因翻译^[48]。由 CRISPR/Cas9 系统介导的原核适应性免疫系统的发现和表征已经彻底改变了生物研究和临床医学的许多方面。Cas 效应器包括经典的 Cas9 和近期研发的 Cas12、Cas13 等系统，后者能够用来构建超灵敏核酸诊断系统^[49]。在通过与靶 RNA 结合激活后，一些 Cas12 和 Cas13 效应子会切割附近的核酸。激活的 Cas13a 降解双生物素和 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein, 6-FAM) 标记的 RNA 探针，可通过荧光或试纸检测。该试纸包含一个 Au-NP 缀合的兔抗 FAM 抗体、带有链霉亲和素的第一捕获线和含抗兔抗体的第二捕获线。最后 Au-NP 聚集产生可见的信号线^[47]。

基于合成生物学技术的即时传染病诊断有着巨大的发展潜力，且部分技术已经应用到临床。

对于资源有限的发展中国家来说，这些技术的广泛应用能够有效控制传染病大规模传播的风险^[50]。

2 合成生物学与细胞疗法

2.1 改造 CAR-T 细胞

CAR-T 细胞是第一个被批准用于癌症免疫治疗的基因修饰细胞产品，它以组织相容性复合体非依赖的方式将 T 细胞靶向癌细胞激活免疫^[51]。2022 年，传奇生物自主研发的 CAR-T 细胞治疗产品 Ciltacabtagene Autoleucel 获批上市，用于治疗复发或难治性多发性骨髓瘤患者，是全球第八个获批上市的 CAR-T 细胞产品。据沙利文《2022 关于创新药物独立市场研究报告》预测，中国在 2025 年 CAR-T 疗法的市场规模将达到 11.5 亿美元。然而移植物抗宿主病 (graft versus-host disease)、复杂的肿瘤内微环境 (tumor microenvironment, TME)、肿瘤间质形成的物理障碍等因素的存在，导致了 CAR-T 细胞在实体瘤和血管系统恶性肿瘤的治疗应用仍存在局限^[52-53]。

CAR-T 细胞在靶向肿瘤组织的过程中存在着肿瘤细胞因抗原转变而逃逸的可能，也会因为识别正常细胞上同源抗原产生脱靶毒性。因此，需要引入更精确靶向肿瘤细胞的控制器，通过向 CAR-T 细胞中导入“逻辑门”系统，为精准可控的 CAR-T 细胞作用提供可能 (图 1)。首先是“与门”，设计含双 CAR 的 CAR-T 细胞，从而更精准靶向表达双抗原的肿瘤细胞，同时避免脱靶效应的产生^[54]。之后是“或门”，通过串联表达多种 CAR 单链可变区，使 CAR-T 细胞识别到其中一种肿瘤细胞相关抗原即可行使杀伤功能，减少肿瘤细胞免疫逃逸的概率^[55]。还有一类“非门”，当 CAR-T 细胞识别肿瘤相关抗原后若同时又识别到正常细胞表面的抗原时，会传递抑制信号抑制 T 细胞的活化，有效预防 CAR-T 细胞对正常细胞的“误伤”^[56]。

合成生物学引入“CAR+X”的策略，通过 CAR 结合多个共刺激结构域、细胞因子、干扰素基因刺激蛋白 (stimulator of interferon genes, STING) 激动剂等多种多样的结构，实现增强 CAR-T 细胞

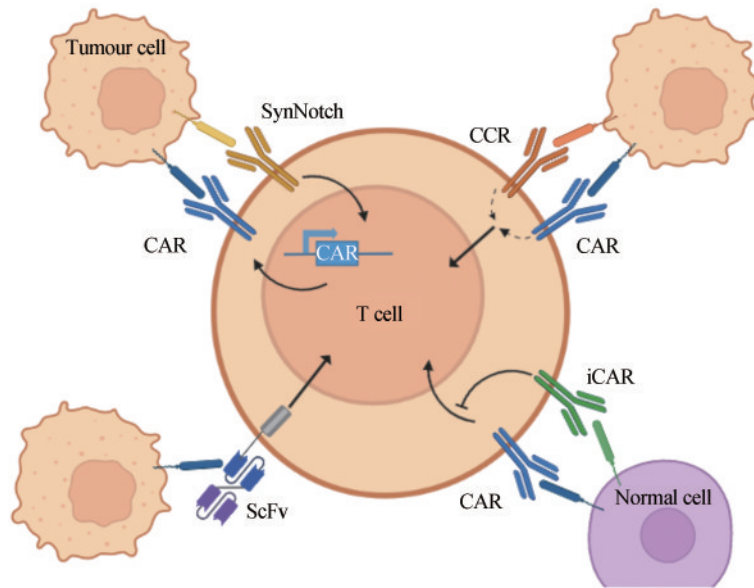


图1 在CAR-T细胞中引入的“逻辑门”系统

“与门”：当 synthetic notch (SynNotch) 受体识别并结合肿瘤抗原时，激活CAR的表达，由CAR识别另一肿瘤抗原后激活T细胞并介导其对肿瘤的杀伤功能（如图左上所示）。另一种“与门”：弱活化信号的CAR和共刺激受体（co-stimulatory receptor, CCR）均不足以单独提供激活T细胞的信号。当两个受体共同识别出对应肿瘤抗原时，才足以激活T细胞功能（如图右上所示）。“或门”：串联表达不同CAR的单链可变区片段（single-chain variable fragment, ScFv），任一ScFv片段识别到对应肿瘤抗原都可以激活T细胞功能（如图左下所示）。“非门”：当CAR识别到肿瘤抗原后激活T细胞，同时当inhibitory CAR (iCAR) 识别到正常细胞抗原时，iCAR发出抑制信号抑制CAR的激活信号从而保护正常细胞（如图右下所示）

Fig. 1 Diagram for the logic gate to CAR-T cells

AND gate: When the synthetic notch (SynNotch) receptor recognizes and binds to a tumor antigen, it activates the expression of CAR to recognize another tumor antigen for activating T cells to mediate its killing function against tumors (as shown in the upper left of the figure). Another AND gate: both CAR and CCR with weak activation signals are not sufficient to activate T cells. When the two receptors jointly recognize the corresponding tumor antigen, the combined signal is sufficient to activate T cell for function (as shown in the upper right of the figure). OR gate: any ScFv fragment expressing different CARs in tandem can activate T cell for function when it recognizes the corresponding tumor antigen (as shown in the lower left of the figure). Not gate: CAR recognizes tumor antigens to activate T cells, but when iCAR recognizes normal cell antigens, it sends out an inhibitory signal to inhibit the activation signal of CAR for the protection of normal cells (as shown in the lower right of the figure)

的持久性和免疫应答强度、克服TME介导的T细胞免疫抑制、浸润实体瘤组织等功能^[57]。例如，将STING激动剂与CAR-T细胞结合，由STING激动剂触发I型干扰素和炎症基因表达，从而激活固有免疫并诱导适应性免疫反应，改变TME内的细胞因子环境，提高CAR-T细胞在实体瘤模型中的转运与持久性^[58]。

结合合成生物学的策略，通过导入调控元件、构建多元化的CAR等方式，使CAR-T细胞以更精准、安全可控、持久的方式作用于癌症细胞，是今后CAR-T细胞发展的主要方向之一。

2.2 改造干细胞

干细胞（stem cell）是具有自我更新和分化特

征的各种细胞的总称，其分化多能性具有巨大的临床应用潜力。利用干细胞的特性，造血干细胞、间充质干细胞、胚胎干细胞等干细胞类型已应用于针对人类疾病的细胞治疗中。截至2022年1月12日，我国已有23个获批的干细胞试验性新药（investigational new drug, IND）、133家干细胞备案医院以及112个干细胞备案项目，表明干细胞治疗具有广阔前景。

T细胞及其他抗癌药物难以渗透TME中达到预期的治疗效果，而干细胞可响应于肿瘤分泌的信号而向肿瘤迁移渗透。因此，同时具有相对非免疫原性与天然肿瘤趋向性的神经干细胞和间充质干细胞是最佳的载药选择^[59-60]。通过在干细胞表面装载抗癌药物，可以使得药物更易进入肿瘤，并减少抗癌药物的全身毒性^[61-62]。2022年诺贝尔

化学奖成果在生物学中的应用使干细胞载药成为可能^[63]。利用无铜点击化学偶联二苯并环辛炔(dibenzocyclooctyne, DBCO)与叠氮化物的反应将DBCO包裹的紫杉醇、免疫检查点抑制剂或其他抗癌药物特异性地传递到肿瘤相关的叠氮化物包被的间充质干细胞中,增强其呈递能力与持久性,诱导抑制肿瘤生长^[64-67]。

干细胞具有的分化多能性使其有发育成人体内各类组织的能力。通过向干细胞中植入光遗传学相关分子,可实现光控制的干细胞治疗。向干细胞中植入光活化的组织分化及功能相关的控制元件,可以实现光控制的细胞分化或细胞功能。Tim Stüdemann等^[68]通过向诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)诱导出的心肌组织中植入PSAM-GlyR与光控制的Ilmo4,使其成为由荧光素酶底物CTZ激活而节律性跳动的工程心脏组织(EHT),并移植入小鼠左心室改善其心脏损伤。

干细胞在发育上的多能性使其相对于其他细胞治疗有着更广阔的应用前景。合成生物学、点击化学、光遗传学等技术,为拓宽干细胞疗法的设计和临床转化提供了更多思路。

3 合成生物学与细菌疗法

人类与体内数亿万种微生物共存。这些微生物创造了复杂的、特定于人体内的生态系统^[69]。

微生物分布于人体的不同区域且可长期生存,这代表着一个可以在体内原位靶向治疗特定疾病的具有巨大潜力的平台。细菌疗法已被证实实在癌症、胃肠道微生物组失调、代谢性疾病和自身免疫性疾病等多种疾病的治疗中存在显著效果^[70]。然而,高昂的费用以及细菌疗法潜在的毒性等因素大大阻碍了细菌疗法在临床上的应用^[71]。

合成生物学的出现从根本上解决了细菌疗法令人诟病的问题。多年来,自然产生的细菌一直被广泛用作益生菌,合成生物学技术则使制造出可以治疗特定疾病或状况的工程益生菌成为了可能(图2)。然而,工程益生菌的临床转化也往往受到遗传不稳定和患者体内工程菌无法控制复制等潜在风险的阻碍。SimCells(简单细胞)是基于合成生物学原理设计,由基因回路控制的无染色体细菌。SimCells可以绕过细菌中天然基因网络的干扰,消除细菌失控生长的风险。研究者们在此基础上对SimCells进行了重编程,使其表面产生纳米抗体以结合结直肠癌细胞的重要生物标志物癌胚抗原。这些靶向癌细胞的SimCells可通过破坏癌细胞的质膜在体外诱导癌细胞死亡^[72]。另外,基于合成生物学原理设计的工程化细菌可作为药物递送系统。研究者们工程化了一种可在肿瘤微环境中特异性裂解并释放抗吞噬细胞受体CD47纳米拮抗剂(CD47nb)的非致病性大肠杆菌菌株。在小鼠同种肿瘤模型中局部注射该菌株可以增加肿瘤浸润性T细胞的活化,刺激肿瘤快速消退,防止

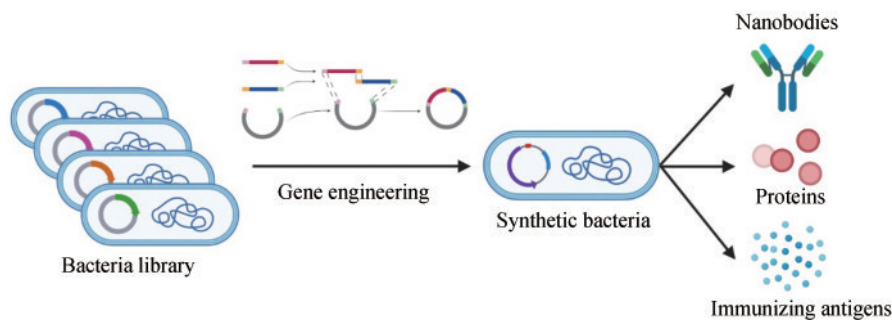


图2 工程细菌生物合成和细菌疗法原理示意图

运用合成生物学应用工程原理,将特化和标准化的DNA序列或基因编码产物等基序混合匹配构建为功能齐全的遗传装置并将其集成到底盘细菌中,最终构建出一个能够产生纳米抗体、分泌特定蛋白或表达免疫抗原刺激免疫通路激活的工程细菌

Fig. 2 Schematic diagram for engineering bacterial biosynthesis and corresponding therapy

With the engineering principles of synthetic biology, specialized and standardized DNA sequences or gene coding products and other sequence motifs are mixed and matched to construct fully functional genetic devices for integrating them into chassis bacteria to finally develop an engineered bacteria that can produce nanobodies, secrete specific proteins or express immune antigens to stimulate the activation of the immune pathways

转移并维持小鼠长期存活^[73]。研究者们设计了一种益生菌系统，使用稳定的裂解释放机制来控制靶向程序性细胞死亡配体1(PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)纳米抗体的产生和肿瘤内释放。单次注射该工程系统显示出增强的治疗应答并使同系小鼠模型的肿瘤消退^[74]。

利用合成生物学构建的抗癌工程菌除了可直接靶向癌细胞和递送药物之外，还可以通过刺激免疫通路激活来实现细菌抗肿瘤免疫治疗。研究者们利用非致病性的大肠杆菌Nissle作为通用平台开发了一种用于治疗癌症的细菌疗法。这种被称为SYNB1891的工程细菌株可以激活抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)的STING通路活性，并激活互补的天然免疫途径。SYNB1891治疗机制是通过在小鼠肿瘤模型和激活的人APC中形成免疫记忆而产生有效的抗肿瘤免疫^[75]。

肠道菌群是人的重要“器官”，纠正肠道微生态失衡已成为解决重大慢性非传染性疾病预防难题的核心策略之一。合成生物学技术手段的迭代发展推动了新型微生态药物的研发，成为纠正肠道微生态失衡并对重大慢病进行精准治疗的关键^[76]。肠道工程菌的应用为肠道疾病的原位治疗提供了可能性。研究者们通过改造乳酸乳球菌构建了表达抗炎分子白介素-10和肿瘤坏死因子- α 纳米抗体的药物递送系统，该系统通过于肠道中原位表达纳米抗体有效降低了肠道炎症水平^[77-78]。此外，肠道工程菌可通过具有双向调节作用的肠脑轴对精神疾病进行治疗。研究者们通过改造乳酸乳球菌等肠道工程菌递送胰高血糖素样蛋白-1和p62蛋白来减少脑部海马区 β -淀粉样蛋白以及缓解氧化应激和炎症，最终治疗阿尔兹海默病^[79-81]。

合成生物系统可以通过工程设计的生物传感器感知和响应各种环境信号，便于通过外部刺激直接操纵生物过程。而相比化学诱导剂和其他环境诱因(如pH值或温度)，光信号具有快速、易调谐和高时空分辨率的优势^[82-83]。具有特定光遗传系统的工程细菌能够在转录或翻译后水平感知光并对光做出反应，从而实现了对细菌行为的光遗传控制^[84]。各类光遗传系统的应用可以实现对细菌的新陈代谢、分裂、死亡、运动及生物被膜形成等行为的精准调控。例如Tandar等^[85]使用一种改

良的蓝藻绿光激活的TCS CcaS/CcaR对代谢基因*pgi*进行转录调节，以调节大肠杆菌中两种不同糖酵解途径之间的通量分布。Miyake等^[86]同样使用TCS CcaS/CcaR系统来控制蓝细菌中编码holin和内毒素的T4噬菌体裂解基因的表达，用于绿光触发的细菌裂解和藻蓝蛋白释放到培养基中，进行生物生产。同时研究者们在大肠杆菌中使用EL222^[87]、LexRO^[88]和LEVI^[89]等光遗传转录调节因子来控制蛋白磷酸酶的表达进而调控细菌运动。此外，光热疗法是一种针对肿瘤的高选择性和非侵入性治疗方式。Yao He课题组^[90]开发了一种用于基于细菌的胶质母细胞瘤光热免疫疗法的药物递送系统，由载有葡萄糖聚合物和光敏吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)硅纳米颗粒的细菌组成。在808 nm激光照射下，ICG产生的光热效应可以破坏细菌细胞和邻近的肿瘤细胞。此外，细菌碎片以及肿瘤相关抗原会促进抗肿瘤免疫反应，从而延长携带胶质母细胞瘤小鼠的存活时间^[90]。

合成生物学技术极大地推动了细菌疗法的进展。与传统的疾病治疗方法相比，细菌介导的治疗方法具有许多优点，如大规模生产成本低、生物工程方法简单。细菌疗法的免疫刺激作用具有多样性，且易于被抗生素控制。合成生物细菌疗法在临床治疗中具有良好的前景，但也必须面对许多挑战，才能确保它们在临床试验中的成功。合成生物细菌疗法面临的一个主要挑战是生物传感器的缺乏，大多数细菌疗法依赖于找到与目标分子相互作用并对其做出反应的现有蛋白质；另一个挑战是精确控制产物输出，细菌可以被改造来生产和分泌小分子和蛋白质药物，但很难严格控制产生药物的数量。

4 合成生物疫苗

疫苗是公共卫生的关键组成部分，有助于降低许多疾病的发病率和死亡率。疫苗的基本目标是使人体在不引起严重疾病的情况下对病原体作出有力反应。疫苗的应用涉及两个主要步骤：选择抗原和将其送入体内。现有疫苗的抗原常使用整体(灭活或减毒活的)微生物或病毒^[47]。遗传

学、生物化学、结构生物学和生物信息学等方面的许多创新使疫苗设计和生产取得了重大进展。同时,合成生物学理论和技术的发展,为疫苗设计和生产提供了更为广阔的空间。目前,运用合成生物学技术的基因组密码子去优化疫苗、DNA疫苗、RNA疫苗及肽疫苗已被批准应用或目前正在临床试验^[91-92]。

4.1 密码子去优化疫苗

由于多种复杂的技术限制,疫苗在安全性和有效性之间的平衡往往难以实现。减毒活病毒可用于生产提供长期保护的高效疫苗。然而,大多数传染病都没有适合的低毒力抗原。常用的连续培养衰减方法需耗时多年,但仍可能无法产生安全的菌株^[93]。完全灭活病毒更容易获得,但经常只诱导产生短期性体液免疫,甚至可能恶化疾病^[94]。因此,开发替代方法,在短时间内产生有效、减毒的活病毒,并尽量减少强毒性病毒毒性的逆转是目前疫苗研究领域所亟需的。低成本核酸合成技术的出现使得合成生物学家能够使用大规模的同义突变来重新设计整个病毒基因组。这种病毒衰减方法的依据是三联体密码子的简并性和许多物种表现出的特定密码子、密码子对和二核苷酸的非随机频率^[95]。合成生物学家利用代表性不足的密码子和密码子对点突变来减少人类细胞中病毒蛋白的产生,从而不需要详细了解病毒功能而快速可靠地产生减毒病毒。根据这种方法产生的突变病毒仍然具有传染性,但毒力严重减弱,而且绝大多数突变在25代以上保持稳定^[96-97]。使用密码子去优化作为一种衰减技术有几个好处:第一,该方法不需要对病毒功能的详细解析,运用计算技术可以从基因组数据中预测蛋白质编码区域和密码子偏差的表征^[98-99];第二,一个不优化的基因组从设计到临床生产的移交最快可以在第48天完成;第三,效价强,减毒活病毒通常会与接触野生型病毒相同的强大免疫反应^[47]。利用密码子去优化来减弱病毒也存在一些缺点。例如,需要根据经验确定每种病毒的最佳突变变量,突变病毒的储存运输条件要求依旧很高。即使高度减毒的活病毒,对免疫系统受损的患者也可能是危险的^[100]。

4.2 DNA和RNA疫苗

基于DNA和RNA的核酸疫苗是将编码病毒成分的DNA或RNA引入人类细胞,然后这些细胞产生病毒抗原肽,重现自然感染过程,以诱导强大的细胞和体液免疫^[100]。核酸可以在没有任何载体分子的情况下传递,即通过裸核酸注射,但是裸核酸易被降解,传递效率非常低^[101]。注射免疫相关细胞的传递和靶向是提高疫苗的免疫原性的主要障碍,因此包装递送问题是核酸疫苗的重大难题^[102]。目前常用的方法有脂质体递送、病毒载体递送、纳米颗粒或微粒递送、电穿孔、Cas9/sgRNA复合物直接递送等^[103]。脂质体是目前最常用的系统之一,脂质体通过与其他辅助脂质组分结合配制可电离脂质,保护核酸在血清和内体区室中的降解而开发^[104]。可电离脂具有胺头基团和非极性脂肪尾,可用于调节膜相互作用^[105]。脂质纳米颗粒(lipid nanoparticles, LNP)的赋形剂包括辅助磷脂,它能促进膜双分子层的形成并帮助内体逃逸,胆固醇能促进膜融合并增强脂质稳定性。最后,聚乙二醇化脂质体可以增加循环时间并减少免疫细胞对LNP的非特异性摄取^[106]。

核酸疫苗的优点包括快速设计和简化的制造流程,且几乎任何蛋白质表位都可以被靶向。核酸疫苗的生产成本和复杂性随序列长度的增加而显著提高,而其传递效率则随之下降。因此,大多数核酸疫苗在5~12 kb范围内^[107]。DNA疫苗与RNA疫苗相比,具有更强的稳定性。早期DNA疫苗备受青睐的原因便是其具有较强的热稳定性^[108],另一个优点是抗原表达时间长,在啮齿动物实验中,抗原表达可持续1.5年^[109]。但其缺点是在早期人体实验中,免疫原性较差^[110]。现代DNA疫苗通过密码子优化、免疫刺激细胞因子的共同使用、流线型质粒和无质粒的双链DNA(double strand DNA, dsDNA)设计,以及无电穿孔的无针肌内注射,提高了免疫原性^[111]。RNA疫苗不需要电穿孔,因为它们只能穿过一个脂质双分子层进行细胞质翻译以产生抗原。RNA疫苗的主要挑战是如何将完整的转录本传递到人类细胞中,因为RNA本质上不如DNA稳定,而且容易被环境和细胞内无处不在的核酸酶快速降解^[112]。合

成生物学和生化方法已被用于增加RNA疫苗的细胞内稳定性,降低细胞毒性,并提高蛋白质产量,例如合成环状编码RNA(circularization of coding RNAs, circRNA),针对mRNA碱基组的合成生物学修饰,使用合成的自扩增mRNA等^[113]。在最新的快速组装circRNAs的方法中,通过优化五个要素(矢量拓扑、5'和3'非翻译区域、核糖体内部入口位点、合成的适体招募翻译启动机制),这些设计原则将环状RNA蛋白产量提高了数百倍,在体内提供了更持久的翻译^[114]。

随着合成生物学的发展以及在疫苗生产设计中的应用,许多的疫苗技术瓶颈不断被突破,合成生物学在疫苗研发中的广泛应用也说明了学术界和工业界之间的高效合作关系。

5 合成生物医学材料

随着科技的迅速发展,合成生物学材料的类型更加多种多样,同时也在越来越多的领域取得重要应用,特别是应用于医学治疗领域的材料,为人类健康发展做出了巨大贡献。自然界中的天然材料因其独特且优秀的特性,为材料科学家提供了源源不断的设计灵感,大量拥有卓越结构功能的仿生材料因此问世,并已投入应用。尽管该领域已取得长足进步,但天然生物材料的许多特性仍然具有挑战性,导致其不能融入合成材料。生物材料由活细胞产生,它们通过信号和遗传程序感知环境条件,从而控制材料的生物合成、重塑、功能化或降解。合成生物学在工程上对生物

材料进行功能设计,使其在生产过程或材料结构上满足工业化生产以及特殊用途,从而得到新型的合成生物学材料。合成生物学新型材料在本质上可划分为多糖材料、核酸材料、蛋白质材料以及具有生命的活细胞材料等(表2)。

5.1 多糖材料

多糖在细胞中可自然产生,一般用于修饰蛋白质和其他生物分子,或作为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的结构成分。目前,多糖形成的生物聚合物在医疗领域具有许多应用场景。例如,多糖材料用于药物输送、伤口愈合以及黏合材料等。

合成生物学为大规模生产多糖提供了特殊的方法。以细菌生产的细菌纤维素为例,细菌纤维素会在细胞周围形成保护性包膜,这种细菌纤维素晶体结构特殊,具有很高的物理强度和高保水能力,并且其也具有类似天然材料的生物降解性,因此细菌纤维素在材料学领域备受关注。在生物医学领域,细菌纤维素用于制作组织工程或人造血管的支架^[115]。利用合成生物学工程方法还可以对材料进行改造,以提高产量或强化特性。其中一个例子是利用基因工程技术,来增加几种醋杆菌科物种自然产生的细菌纤维素产量。具体方法是使用驹形杆菌菌株生产细菌纤维素,这些菌株具有高度的耐酸性,可以大量自然产生细菌纤维素。除了引入或删除基因以提高细菌纤维素的产量外,还能将一些基因引入产生细菌纤维素的物

表2 合成生物医学材料总结

Table 2 Summary of synthetic biomedical materials

材料种类	材料名称	材料特性	参考文献
多糖材料	细菌纤维素	高物理强度和高保水能力,可生产人造血管支架	[115]
	纤维素-几丁质共聚物	可作为静脉假体,在动物体内能被降解	[116]
核酸材料	ssDNA 纳米材料	制作病原体传感器,对动物体内的病原体进行探测	[117]
	RNA 纳米材料	控制体内细胞代谢过程	[118]
蛋白质材料	弹性蛋白样多肽	用于组织工程和药物递送	[119]
	弹性蛋白样重组体	制作基于ELR的水凝胶,用于传递药物和疫苗	[120]
活细胞材料	curli 纳米纤维	与生物膜融合后可结合在特定表面,用于治疗小鼠胃肠道炎症	[121]
	大肠杆菌 ECM 材料	生产抗肿瘤药物——脱氧紫罗兰素	[122]
	<i>E.coli</i> Nissle 材料	一种无毒性的大肠杆菌材料,对患者进行持续给药	[123]
	枯草芽孢杆菌水凝胶	具有多功能再生和可调性,可作为潜在的医疗生物材料	[124]

种中以提供新的代谢途径，得到改良的新材料^[125]。例如，在驹形杆菌菌株中引入来自白色念珠菌的三个基因操纵子，使其能够产生纤维素-几丁质共聚物。与普通纤维素的不同之处在于，它可以被动物溶菌酶降解。这种新型的多糖合成材料能够作为动物或人类手术过程中的支架和静脉假体等材料，无需后续的手术切除^[116]。因此，通过合成生物学技术改造获得的优秀生物降解能力为该材料在临床治疗中的广泛应用打下了基础。

5.2 核酸材料

DNA 纳米材料目前已经成为了一个活跃研究领域的代名词。基于 DNA 的纳米结构，通过特定碱基配对原则来设计合成特定序列的 DNA 分子，已在生物医学、生物成像和诊断中开创了许多不同的应用。例如用于针对病原体的纳米级光学传感器的开发^[117]。DNA 纳米结构通常由单链 DNA (single strand DNA, ssDNA) 组装而成，但由于不够稳定，ssDNA 在活细胞中并不能大量存在。Voigt 课题组^[126]通过改造大肠杆菌克服了这一瓶颈，使其含有 dsDNA，该 dsDNA 被转录为非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)，并且其中含有 HIV 终止子结合位点 (HIV terminator binding site, HTBS)。HTBS 能招募 HIV 逆转录酶 (HIV reverse transcriptase)，然后合成所需的 ssDNA，并在细胞内进行组装，自发形成了 ssDNA 交叉纳米结构。由于 HIV 逆转录酶能对 DNA 合成进行核化，并在鼠白血病逆转录酶 (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) 作用下进行延伸^[126]。因此该技术为大规模生产核酸纳米材料提供了一种具有成本效益的方法，并在生物医学中具有前瞻性应用，例如，可以通过引入功能性 RNA 纳米材料来控制体内细胞过程^[118]。

5.3 蛋白质材料

蛋白质在合成生物学领域扮演着重要的角色。通过对已有的蛋白质进行序列改造，可以使其具有许多特殊的功能结构，从而获得一些特殊的用途。目前已经在工业生产等领域取得较为显著的发展。在疾病治疗上同样存在相应的例子，以弹

性蛋白为例，通过对其高延展性的利用设计，可在医疗上发挥重要作用。

弹性蛋白样多肽 (elastin-like polypeptide, ELP) 是来源于人类弹性蛋白刺激响应的一类蛋白质聚合物，由五肽重复序列 Val-Pro-Gly-X-Gly 组成，具有优秀的弹性和组装能力^[119]。ELP 具有低溶解温度和低免疫原性等特性，使其成为生物医学应用领域中十分具有吸引力的优秀生物材料。弹性蛋白样重组体 (elastin-like recombinants, ELR) 是来源于天然弹性蛋白中的一个重复结构域，是胞外基质的成分之一，其功能是使组织器官具有弹性。通过合成生物学手段，未加工的材料前体会被进一步设计加工，使所得材料具有特殊性质或引入新的功能。例如在组织工程中，特殊设计用于制作水凝胶的 ELP 就是在原结构基础上设计，从而更加适用于携带相应药物。基于 ELR 和 ELP 的生物材料，可作为一种药物递送载体。通过在 ELR 或 ELP 材料中携带目的药物来实现长期递送，使得药物更好在相应靶器官或靶细胞发挥其功效^[127]。

在过去的几年中，对于 ELR 和 ELP 的合成生物学设计层出不穷，它们已经成为组织工程以及药物递送领域中的多功能可定制材料。科学家能够对其序列进行精准的控制，从而得到所需要的生物材料特性。正因如此，其应用领域和适用范围得以不断扩展。目前基于 ELR 的水凝胶材料已经在疫苗、基因递送系统和生物医学应用中广泛使用^[120]。

5.4 活细胞材料

除了以上由机体有机物为基础设计出的合成生物学材料外，还有一类包括活细胞体的系统，被称为活细胞材料。

许多细菌物种通过 ECM 来保护细菌体本身，这种保护性 ECM 由糖和蛋白质构成，极少部分还包括核酸结构。在过去的几年里，基于这种天然 ECM 设计，具有各种各样特性的 ECM 材料得到开发。这些特殊的生物材料既存在适用于临床治疗的种类，也存在适用于环境改造和工业生产的种类。curli 是由细菌产生的一种功能性的淀粉样纳

米纤维，可以形成薄膜状结构包裹在细菌表面，目前被广泛用于组装活体材料或生物材料领域研究。基于 curli 的生物膜生产已成为合成生物学领域的重要研究目标，以设计用于生物医学、环境或电子应用的 ECM。已有多项研究通过将 CsgA（一种能组装 curli 的蛋白质）作为生物膜的主要成分融合到不同的蛋白质结构域中，来设计基于 curli 的 ECM 特性材料。例如，具有特异性的结构域可以使生物膜黏附在特定的表面上。Joshi 课题组^[121]开发了一种基于大肠杆菌的生物膜，该生物膜在给小鼠口服后可特异性定位于肠黏膜。这一过程是通过将 curli 蛋白与黏蛋白结合三叶因子（mucin-binding trefoil factor, cTFF2）的融合来实现的。由于材料的活体部分（大肠杆菌）可自动再生，因此该材料可以保持至少 5 天时间。如今类似的合成生物材料系统已被用于治疗小鼠的胃肠道炎症^[121]。

合成生物学的出现为开发活体生物材料的治疗策略打开了大门，以治疗需要长期持续给药性疾病。这些策略基于使用材料包埋的产药细菌或哺乳动物细胞，以提供持续和适应患者的治疗药物递送。Sankaran 课题组^[122]开发了基于细菌 ECM 的光刺激响应治疗化合物。在选择宿主细胞时，他们使用了不含内毒素的大肠杆菌（ClearColi），目的是防止人体与其外膜脂多糖发生识别而产生内毒素反应。随后通过表达 vio-ABCE 操纵子以合成抗菌和抗肿瘤药物——脱氧紫罗兰素^[122]。并且为确保患者安全，最新的研究主要集中在 *E. coli* Nissle 1917 益生菌上，防止细菌本身对患者造成影响^[123]。

中国科学院深圳先进技术院的钟超课题组^[128]也开发了通过光诱导生物膜矿化制造的生物材料。他们使用蓝光诱导融合有 CsgA 与贻贝足蛋白 Mfp3S（mytilus edulis foot protein 3S）的生物膜。Mfp3S 富含 Asp、Lys 和 Tyr 残基，可促进羟基磷灰石的成核、生长和黏附。因此这种方法可应用于表面缺陷的特定位置修复，对医疗领域可能有潜在的促进作用。该课题组^[124]还设计了基于枯草芽孢杆菌的生物膜，以生产具有弹性的水凝胶材料，这些材料可以通过使用 3D 打印形成具有特殊形状的微小结构。这些材料具有多功能、再生和可调

的特性，因此是一种适合用于医学治疗中的生物材料。

6 合成生物学与新药研发

合成生物学作为一门新兴学科，在药物研发领域拥有广泛的应用前景。本部分将以针对 COVID-19 病毒的药物研发为例，介绍几种新兴合成生物学工具在疾病机制研究、药物筛选、新药生产等过程中的应用（图 3）。

6.1 基因编辑动物模型

COVID-19 是一种目前全球大流行的冠状病毒病原体，尚缺乏特效治疗药物。针对 COVID-19 的药物筛选需要一种能够用于评估药物对 COVID-19 疗效的实验动物模型。然而传统手段面临的困难在于，野生型实验小鼠缺乏与病毒 S 刺突蛋白结合的人类受体血管紧张素转换酶 2（angiotensin-converting enzyme 2, ACE2），因此难以感染 COVID-19^[129]。面对这种由实验物种与人类之间物种差异性带来的研究困境，新兴的合成生物学技术却可以有效应对手段。比如在慢性 COVID-19 后遗症的研究中，利用人源造血干细胞移植以及替换免疫同源基因的方式构建人源性模型小鼠，使其获得与人类免疫表达相近的免疫系统，再用腺病毒载体递送人源性 ACE2 蛋白。通过建立这一小鼠模型，解决了啮齿类动物不具备长期免疫代谢机制的问题^[130]。这种构建基因编辑动物模型的方式，一定程度地解决了传统实验模型中物种差异对疾病研究的影响。

6.2 类器官模型

类器官是专能干细胞、多能干细胞或者胚胎干细胞，通过体外诱导分化的方式构建而成的呈现原始组织特征的 3D 模型。它们由各种类型的细胞组成，并极大地在体外培养中再现了亲代器官的基本结构和生理特征^[131]。与之相比，体外实验的传统细胞系大多是恶性来源，不能模拟细胞-细胞和细胞-基质的相互作用。在传统的二维培养中，

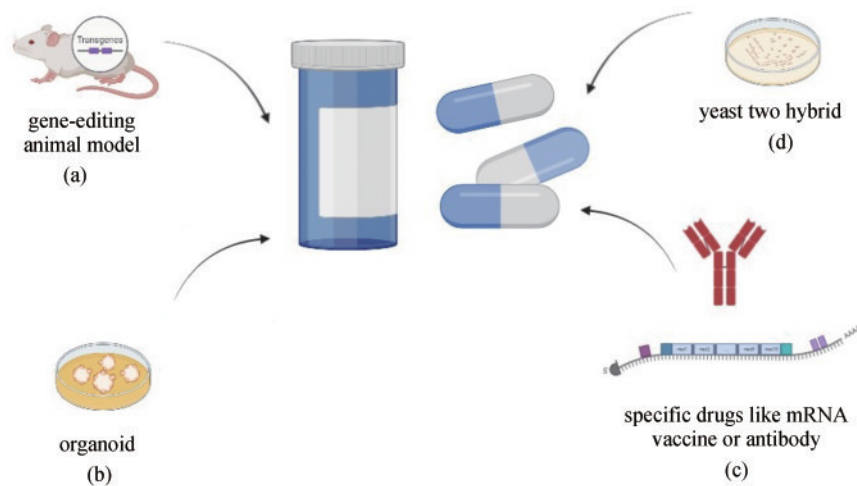


图3 合成生物学在新药研发中的应用

(a) 在药物机制研究中构建基因编辑动物模型；(b) 在药物筛选与机制研究中使用类器官模型；
(c) 生产特异性药物，如mRNA疫苗和特异性抗体；(d) 在抗体生产和筛选过程中应用广泛的酵母双杂交技术

Fig. 3 Applications of synthetic biology in drug discovery

(a) Building animal models for gene-editing in drug mechanism research; (b) Building organoid models for drug screening and mechanism discovery;
(c) Expressing specific drugs like mRNA vaccines or antibodies; (d) Yeast two-hybrid technology for screening and producing antibodies

体内感染状态和病理特征也可能难以再现。据报道，COVID-19不仅仅能感染肺部，还会影响多个人体器官。而目前发展出来的多种类器官平台，如人类肠道、肺、肾、肝、胃、眼、大脑和心脏系统的类器官，可在器官水平研究COVID-19的致病机理和治疗策略^[132]。研究者们正在尝试使用不同组织类器官与免疫细胞共培养，以进一步研究COVID-19在人体各器官中发挥作用的真实情况^[131]。

因此，作为合成生物学带来的重要工具，与传统细胞培养相比，类器官为研究疾病机制提供了更为可信的体外模型。另一方面，类器官模型在药物研发过程中也可以作为新旧药物的筛选工具。比如，已有研究通过构建人源性肺组织类器官与结肠类器官并结合高通量筛选，在COVID-19大流行期间从FDA已批准的药物中筛选出伊马替尼、霉酚酸和盐酸奎那克林，作为潜在治疗药物^[133]。另外有研究对瑞德西韦、洛匹那韦和奈非那韦的抗病毒效果进行了类器官水平的验证，证实了上述药物可能存在的药用及毒副作用^[134]。

6.3 生产特异性药物

在应对COVID-19大流行中，广泛使用的单克

隆中和抗体、mRNA疫苗、蛋白疫苗，所有这些耳熟能详的产品类型都属于合成生物学产物。以mRNA疫苗为例，其原理是将编码COVID-19标志性蛋白的mRNA经过递送载体导入细胞，从而利用人体细胞内核糖体表达对应识别蛋白，呈递到细胞膜表面引发针对此蛋白的特异性免疫反应^[135]。再比如在单克隆抗体应用中，使用可直接破坏病毒生命周期的特定治疗分子，如融合抑制剂肽、针对SARS-CoV-2的中和抗体、抗ACE2单克隆抗体和蛋白酶抑制剂等^[136]。这些药物产品的共同特征就是，相比传统的广谱药物而言，增强了药物对疾病的特异性，降低了用药过程中可能存在的副作用。

6.4 酵母双杂交系统

另外值得关注的是，合成生物学中的酵母双杂交系统也在药物开发中具有广泛应用。而酵母双杂交系统原理是利用真核生物转录激活过程中，两个同时需要的结构域：DNA结合域与转录激活结构域。它们并不需要直接连接，只需要足够靠近即可激活转录。因此，当两个潜在能够相互结合的蛋白分别与两个结构域组成融合蛋白，如果这两个潜在蛋白存在结合的可能，那么足够靠近

的两个结构域将激活下游报告基因的转录^[137]。而利用这一合成生物学技术,可以帮助制备相关特异性识别抗体。比如郑美云等^[138]通过提取P53免疫的小鼠脾脏细胞RNA,利用PCR技术获得相关抗体链的cDNA,而后再利用酵母双杂交技术,将携带抗体链cDNA的载体与含有P53蛋白的诱饵载体一同导入酵母细胞,只有当抗体链与P53蛋白高度结合后才能够表达阳性。利用这项技术成功筛选出可以准确识别P53蛋白的抗体^[138]。因相对准确度高,易于高通量大规模筛选,酵母双杂交系统已经在抗体相关药物制备中广泛使用。

总而言之,相较于传统手段而言,新兴合成生物学工具以及产物在药物研发方面有独特优势。它可以扩展对疾病未知机制的认识,提高药物筛选的效率,生产特异性针对疾病的药物等等。其中最具代表性的如合成动物模型、类器官模型、特异性药物等,这些新兴工具正在影响着现代药物研发的进程。

7 结论与展望

综上所述,合成生物学已在疾病诊疗的各个方面发挥重要作用。基于基因回路的疾病诊疗方法将是合成生物学重要发展方向之一,并将在未来彻底改变临床疾病的诊疗方式。然而,目前合成生物学在疾病诊疗应用中的局限性也十分明显。首先是效应强度,基因回路所产生的效应可能过强或者过低达不到调节需求;基因回路作用难以预测,尽管每个组件功能明确,但是在组装工作后,在体外或体内不能达到预期设想;基因回路组件与机体不兼容,合成的基因回路放入体内后宿主可能产生免疫排斥反应;另外,基因回路研究及临床转化成本高,价格高昂,也是当前面临的主要问题。

合成生物学在人类疾病的诊疗应用中具备极大的发展潜力,但我们目前对大多数疾病的发病机制,尤其是在对于诊断治疗至关重要的疾病早期阶段的发病机制认识仍然不足^[139]。疾病早期的生物标志物数量较少,且同一种生物标志物的异质化程度较高^[36]。尽管已有众多基于合成生物学设计的新药进入临床试验阶段,其仍面临一些实

际问题和技术挑战。例如,如何有效避免脱靶效应,提高编辑效率,降低免疫原性等问题,均局限着合成生物学技术在临床诊疗中的广泛应用。在合成生物学蓬勃发展的同时,合成生物学技术应主动和其他诊疗技术或交叉学科进一步结合。未来需要更加深入的合成生物学基础研究来满足临床早期诊断和精准治疗的需求。

参 考 文 献

- [1] YE H F, FUSSENEGGER M. Synthetic therapeutic gene circuits in mammalian cells[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(15): 2537-2544.
- [2] ELOWITZ M B, LEIBLER S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 335-338.
- [3] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [4] KRAMER B P, FISCHER C, FUSSENEGGER M. BioLogic gates enable logical transcription control in mammalian cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(4): 478-484.
- [5] BECSKEI A, SERRANO L. Engineering stability in gene networks by autoregulation[J]. *Nature*, 2000, 405(6786): 590-593.
- [6] KITADA T, DIANDRETH B, TEAGUE B, et al. Programming gene and engineered-cell therapies with synthetic biology[J]. *Science*, 2018, 359(6376): eaad1067.
- [7] BATEY R T, GILBERT S D, MONTANGE R K. Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 411-415.
- [8] BADORREK C S, GHERGHE C M, WEEKS K M. Structure of an RNA switch that enforces stringent retroviral genomic RNA dimerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(37): 13640-13645.
- [9] SIUTI P, YAZBEK J, LU T K. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(5): 448-452.
- [10] KEMMER C, GITZINGER M, DAOUD-EL BABA M, et al. Self-sufficient control of urate homeostasis in mice by a synthetic circuit[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(4): 355-360.
- [11] RICHARDS R M, ZHAO F F, FREITAS K A, et al. NOT-gated CD93 CAR T cells effectively target AML with minimized endothelial cross-reactivity[J]. *Blood Cancer Discovery*, 2021, 2(6): 648-665.
- [12] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345.

- [13] MCNERNEY M P, DOIRON K E, NG T L, et al. Theranostic cells: emerging clinical applications of synthetic biology[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(11): 730-746.
- [14] ENDY D. Foundations for engineering biology[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 449-453.
- [15] SLUSARCZYK A L, LIN A, WEISS R. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(6): 406-420.
- [16] WANG Y H, WEI K Y, SMOLKE C D. Synthetic biology: advancing the design of diverse genetic systems[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2013, 4: 69-102.
- [17] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [18] YIN H, XUE W, CHEN S D, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(6): 551-553.
- [19] BAKONDI B, LV W J, LU B, et al. *In vivo* CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(3): 556-563.
- [20] LIANG C, LI F F, WANG L Y, et al. Tumor cell-targeted delivery of CRISPR/Cas9 by aptamer-functionalized lipopolymer for therapeutic genome editing of VEGFA in osteosarcoma[J]. *Biomaterials*, 2017, 147: 68-85.
- [21] KAN M J, DOUDNA J A. Treatment of genetic diseases with CRISPR genome editing[J]. *JAMA*, 2022, 328(10): 980-981.
- [22] SOLEIMANY A P, BHATIA S N. Activity-based diagnostics: an emerging paradigm for disease detection and monitoring[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2020, 26(5): 450-468.
- [23] SLOMOVIC S, PARDEE K, COLLINS J J. Synthetic biology devices for *in vitro* and *in vivo* diagnostics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(47): 14429-14435.
- [24] TIAN Q, PRICE N D, HOOD L. Systems cancer medicine: towards realization of predictive, preventive, personalized and participatory (P4) medicine[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2012, 271(2): 111-121.
- [25] SIU A L. Screening for breast cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2016, 164(4): 279-296.
- [26] US Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement[J]. *JAMA*, 2016, 315(23): 2564-2575.
- [27] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2020, 70(1): 7-30.
- [28] LUTZ A M, WILLMANN J K, COCHRAN F V, et al. Cancer screening: a mathematical model relating secreted blood biomarker levels to tumor sizes[J]. *PLoS Medicine*, 2008, 5(8): e170.
- [29] KWONG G A, GHOSH S, GAMBOA L, et al. Synthetic biomarkers: a twenty-first century path to early cancer detection[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21(10): 655-668.
- [30] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [31] KWON E J, DUDANI J S, BHATIA S N. Ultrasensitive tumour-penetrating nanosensors of protease activity[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 54.
- [32] KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [33] DUDANI J S, IBRAHIM M, KIRKPATRICK J, et al. Classification of prostate cancer using a protease activity nanosensor library[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(36): 8954-8959.
- [34] KWONG G A, VON MALTZAHN G, MURUGAPPAN G, et al. Mass-encoded synthetic biomarkers for multiplexed urinary monitoring of disease[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(1): 63-70.
- [35] DUDANI J S, WARREN A D, BHATIA S N. Harnessing protease activity to improve cancer care[J]. *Annual Review of Cancer Biology*, 2018, 2: 353-376.
- [36] BHANG H E C, GABRIELSON K L, LATERRA J, et al. Tumor-specific imaging through progression elevated gene-3 promoter-driven gene expression[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(1): 123-129.
- [37] AALIPOUR A, CHUANG H Y, MURTY S, et al. Engineered immune cells as highly sensitive cancer diagnostics[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(5): 531-539.
- [38] NIU G, CHEN X Y. Molecular imaging with activatable reporter systems[J]. *Theranostics*, 2012, 2(4): 413-423.
- [39] REAGAN M R, KAPLAN D L. Concise review: mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(6): 920-927.
- [40] ZHOU S B, GRAVEKAMP C, BERMUDEZ D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(12): 727-743.
- [41] WEI T Y, CHENG C M. Synthetic biology-based point-of-care diagnostics for infectious disease[J]. *Cell Chemical Biology*, 2016, 23(9): 1056-1066.
- [42] SHORR A F, MICEK S T, JACKSON W L, et al. Economic implications of an evidence-based sepsis protocol: can we improve outcomes and lower costs? [J]. *Critical Care Medicine*, 2007, 35(5): 1257-1262.
- [43] MANI V, WANG S Q, INCI F, et al. Emerging technologies for monitoring drug-resistant tuberculosis at the point-of-care[J].

- Advanced Drug Delivery Reviews, 2014, 78: 105-117.
- [44] COURBET A, ENDY D, RENARD E, et al. Detection of pathological biomarkers in human clinical samples *via* amplifying genetic switches and logic gates[J]. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(289): 289ra83.
- [45] DONALDSON T, DATTELBAUM J D. Designing a thermo-stable switch-based biosensor[J]. *Biophysical Journal*, 2014, 106(2): 810a.
- [46] SILVERMAN A D, KARIM A S, JEWETT M C. Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(3): 151-170.
- [47] TAN X, LETENDRE J H, COLLINS J J, et al. Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics[J]. *Cell*, 2021, 184(4): 881-898.
- [48] GREEN A A, SILVER P A, COLLINS J J, et al. Toehold switches: *de-novo*-designed regulators of gene expression[J]. *Cell*, 2014, 159(4): 925-939.
- [49] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67-83.
- [50] LESLIE H H, SPIEGELMAN D, ZHOU X, et al. Service readiness of health facilities in Bangladesh, Haiti, Kenya, Malawi, Namibia, Nepal, Rwanda, Senegal, Uganda and the United Republic of Tanzania[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2017, 95(11): 738-748.
- [51] JUNE C H, SADELAIN M. Chimeric antigen receptor therapy[J]. *New England Journal of Medicine*, 2018, 379(1): 64-73.
- [52] LANITIS E, DANGAJ D, IRVING M, et al. Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors[J]. *Annals of Oncology*, 2017, 28(suppl_12): xii18-xii32.
- [53] LANITIS E, IRVING M, COUKOS G. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2015, 33: 55-63.
- [54] KLOSS C C, CONDOMINES M, CARTELLIERI M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(1): 71-75.
- [55] WU M R, JUSIAK B, LU T K. Engineering advanced cancer therapies with synthetic biology[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 19(4): 187-195.
- [56] FEDOROV V D, THEMELI M, SADELAIN M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(215): 215ra172.
- [57] SADELAIN M. Chimeric antigen receptors: a paradigm shift in immunotherapy[J]. *Annual Review of Cancer Biology*, 2017, 1: 447-466.
- [58] XU N, PALMER D C, ROBESON A C, et al. STING agonist promotes CAR T cell trafficking and persistence in breast cancer[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2021, 218(2): e20200844.
- [59] LÓPEZ-LÁZARO M. The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site. Rethinking metastasis[J]. *Oncoscience*, 2015, 2(5): 467-475.
- [60] LANDSKRON G, DE LA FUENTE M, THUWAJIT P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment[J]. *Journal of Immunology Research*, 2014, 2014: 149185.
- [61] ABOODY K S, NAJBAUER J, DANKS M K. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy[J]. *Gene Therapy*, 2008, 15(10): 739-752.
- [62] SPAETH E, KLOPP A, DEMBINSKI J, et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells[J]. *Gene Therapy*, 2008, 15(10): 730-738.
- [63] TAKAYAMA Y, KUSAMORI K, NISHIKAWA M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery[J]. *Molecules*, 2019, 24(1): 172.
- [64] LAYEK B, SADHUKHA T, PRABHA S. Glycoengineered mesenchymal stem cells as an enabling platform for two-step targeting of solid tumors[J]. *Biomaterials*, 2016, 88: 97-109.
- [65] HARGADON K M, JOHNSON C E, WILLIAMS C J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: an overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 62: 29-39.
- [66] DARVIN P, TOOR S M, SASIDHARAN NAIR V, et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(12): 1-11.
- [67] HU Q Y, SUN W J, WANG J Q, et al. Conjugation of haematopoietic stem cells and platelets decorated with anti-PD-1 antibodies augments anti-leukaemia efficacy[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(11): 831-840.
- [68] STÜDEMANN T, RÖSSINGER J, MANTHEY C, et al. Contractile force of transplanted cardiomyocytes actively supports heart function after injury[J]. *Circulation*, 2022, 146(15): 1159-1169.
- [69] LLOYD-PRICE J, ABU-ALI G, HUTTENHOWER C. The healthy human microbiome[J]. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 51.
- [70] YU H. Bacteria-mediated disease therapy[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(6): 1107-1113.
- [71] FLORES BUESO Y, LEHOURITIS P, TANGNEY M. *In situ* biomolecule production by bacteria; a synthetic biology approach to medicine[J]. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 2018, 275: 217-228.
- [72] LIM B, YIN Y T, YE H, et al. Reprogramming synthetic cells for targeted cancer therapy[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022,

- 11(3): 1349-1360.
- [73] CHOWDHURY S, CASTRO S, COKER C, et al. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic anti-tumor immunity[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1057-1063.
- [74] GURBATHI C R, LIA I, VINCENT R, et al. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies[J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(530): eaax0876.
- [75] LEVENTHAL D S, SOKOLOVSKA A, LI N, et al. Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2739.
- [76] 高梦学, 王丽娜, 黄鹤. 合成生物学在肠道微生态疗法研发中的应用[J]. *合成生物学*, 2022, 3(1): 35-52.
GAO M X, WANG L N, HUANG H. Advances in synthetic biology assisted intestinal microecological therapy[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(1): 35-52.
- [77] STEIDLER L, HANS W, SCHOTTE L, et al. Treatment of murine colitis by lactococcus lactis secreting interleukin-10[J]. *Science*, 2000, 289(5483): 1352-1355.
- [78] VANDENBROUCKE K, DE HAARD H, BEIRNAERT E, et al. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis[J]. *Mucosal Immunology*, 2010, 3(1): 49-56.
- [79] FANG X, ZHOU X T, MIAO Y Q, et al. Therapeutic effect of GLP-1 engineered strain on mice model of Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 80.
- [80] CHEN T T, TIAN P Y, HUANG Z X, et al. Engineered commensal bacteria prevent systemic inflammation-induced memory impairment and amyloidogenesis *via* producing GLP-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17): 7565-7575.
- [81] CECARINI V, BONFILI L, GOGOI O, et al. Neuroprotective effects of p62(SQSTM1)-engineered lactic acid bacteria in Alzheimer's disease: a pre-clinical study[J]. *Aging*, 2020, 12(16): 15995-16020.
- [82] LINDNER F, DIEPOLD A. Optogenetics in bacteria-applications and opportunities[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(2): fuab055.
- [83] BAUMSCHLAGER A, KHAMMASH M. Synthetic biological approaches for optogenetics and tools for transcriptional light-control in bacteria[J]. *Advanced Biology*, 2021, 5(5): e2000256.
- [84] WEI J J, Jin F. Illuminating bacterial behaviors with optogenetics[J]. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2022, 26(6): 101023.
- [85] TANDAR S T, SENOO S, TOYA Y, et al. Optogenetic switch for controlling the central metabolic flux of *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 68-75.
- [86] MIYAKE K, ABE K, FERRI S, et al. A green-light inducible lytic system for cyanobacterial cells[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 56.
- [87] LI X, ZHANG C C, XU X P, et al. A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(6): e33.
- [88] ZHANG J Y, LUO Y H, POH C L. Blue light-directed cell migration, aggregation, and patterning[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(10): 3137-3148.
- [89] CHEN X J, LIU R M, MA Z C, et al. An extraordinary stringent and sensitive light-switchable gene expression system for bacterial cells[J]. *Cell Research*, 2016, 26(7): 854-857.
- [90] SUN R, LIU M Z, LU J P, et al. Bacteria loaded with glucose polymer and photosensitive ICG silicon-nanoparticles for glioblastoma photothermal immunotherapy[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5127.
- [91] KANEKIYO M, ELLIS D, KING N P. New vaccine design and delivery technologies[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 219(S1): S88-S96.
- [92] SKWARCZYNSKI M, TOTH I. Peptide-based synthetic vaccines[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(2): 842-854.
- [93] ALLEMAN M M, JORBA J, GREENE S A, et al. Update on vaccine-derived poliovirus outbreaks-worldwide, July 2019-February 2020[J]. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2020, 69(16): 489-495.
- [94] POLACK F P, HOFFMAN S J, CRUJEIRAS G, et al. A role for nonprotective complement-fixing antibodies with low avidity for measles virus in atypical measles[J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(9): 1209-1213.
- [95] LE NOUËN C, COLLINS P L, BUCHHOLZ U J. Attenuation of human respiratory viruses by synonymous genome recoding[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1250.
- [96] COLEMAN J R, PAPAMICHAIL D, SKIENA S, et al. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias[J]. *Science*, 2008, 320(5884): 1784-1787.
- [97] BURNS C C, SHAW J, CAMPAGNOLI R, et al. Modulation of poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(7): 3259-3272.
- [98] SCHLUB T E, BUCHMANN J P, HOLMES E C. A simple method to detect candidate overlapping genes in viruses using single genome sequences[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(10): 2572-2581.
- [99] ATHEY J, ALEXAKI A, OSIPOVA E, et al. A new and updated resource for codon usage tables[J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 391.
- [100] TULLOCH F, ATKINSON N J, EVANS D J, et al. RNA virus attenuation by codon pair deoptimisation is an artefact of increases in CpG/UpA dinucleotide frequencies[J]. *eLife*, 2014, 3: e04531.

- [101] JONES K L, DRANE D, GOWANS E J. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies[J]. *BioTechniques*, 2007, 43(5): 675-681.
- [102] MCMAHON H T, GALLOP J L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling[J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 590-596.
- [103] GUPTA A, ANDRESEN J L, MANAN R S, et al. Nucleic acid delivery for therapeutic applications[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 178: 113834.
- [104] WHITEHEAD K A, LANGER R, ANDERSON D G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8(2): 129-138.
- [105] ALLEN T M, CULLIS P R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(1): 36-48.
- [106] ALLISON S J, MILNER J. RNA interference by single- and double-stranded siRNA with a DNA extension containing a 3' nuclease-resistant mini-hairpin structure[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2014, 2: e141.
- [107] KUDCHODKAR S B, CHOI H, REUSCHEL E L, et al. Rapid response to an emerging infectious disease - lessons learned from development of a synthetic DNA vaccine targeting Zika virus[J]. *Microbes and Infection*, 2018, 20(11/12): 676-684.
- [108] TEBAS P, KRAYNYAK K A, PATEL A, et al. Intradermal SynCon® Ebola GP DNA vaccine is temperature stable and safely demonstrates cellular and humoral immunogenicity advantages in healthy volunteers[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 220(3): 400-410.
- [109] WOLFF J A, LUDTKE J J, ACSADI G, et al. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle[J]. *Human Molecular Genetics*, 1992, 1(6): 363-369.
- [110] LI L, PETROVSKY N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2016, 15(3): 313-329.
- [111] GAUDINSKI M R, HOUSER K V, MORABITO K M, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials[J]. *The Lancet*, 2018, 391(10120): 552-562.
- [112] REICHMUTH A M, OBERLI M A, JAKLENEC A, et al. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles[J]. *Therapeutic Delivery*, 2016, 7(5): 319-334.
- [113] PARDI N, HOGAN M J, WEISSMAN D. Recent advances in mRNA vaccine technology[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2020, 65: 14-20.
- [114] CHEN R, WANG S K, BELK J A, et al. Engineering circular RNA for enhanced protein production[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41, 262-272.
- [115] WANG J, TAVAKOLI J, TANG Y H. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods - a review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 219: 63-76.
- [116] SINGH A, WALKER K T, LEDESMA-AMARO R, et al. Engineering bacterial cellulose by synthetic biology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9185.
- [117] MATHUR D, MEDINTZ I L. The growing development of DNA nanostructures for potential healthcare-related applications[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(9): e1801546.
- [118] LI M, ZHENG M X, WU S Y, et al. *In vivo* production of RNA nanostructures via programmed folding of single-stranded RNAs[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2196.
- [119] MCDANIEL J R, RADFORD D C, CHILKOTI A. A unified model for *de novo* design of elastin-like polypeptides with tunable inverse transition temperatures[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(8): 2866-2872.
- [120] IBÁÑEZ-FONSECA A, FLORA T, ACOSTA S, et al. Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials[J]. *Matrix Biology*, 2019, 84: 111-126.
- [121] DURAJ-THATTE A M, DORVAL COURCHESNE N M, PRAVESCHOTINUNT P, et al. Hydrogels: genetically programmable self-regenerating bacterial hydrogels[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(40): 1901826.
- [122] SANKARAN S, BECKER J, WITTMANN C, et al. Optoregulated drug release from an engineered living material: self-replenishing drug depots for long-term, light-regulated delivery[J]. *Small*, 2019, 15(5): e1804717.
- [123] OU B M, YANG Y, THAM W L, et al. Genetic engineering of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 for clinical application[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(20): 8693-8699.
- [124] XU L J, WANG X Y, SUN F, et al. Harnessing proteins for engineered living materials[J]. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2021, 25(1): 100896.
- [125] RYNGAJŁO M, JĘDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA M, KUBIAK K, et al. Towards control of cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter* using systems-level and strain engineering strategies: current progress and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(15): 6565-6585.
- [126] ELBAZ J, YIN P, VOIGT C A. Genetic encoding of DNA nanostructures and their self-assembly in living bacteria[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11179.
- [127] VARANKO A K, SU J C, CHILKOTI A. Elastin-like polypeptides for biomedical applications[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2020, 22: 343-369.
- [128] WANG Y Y, AN B L, XUE B, et al. Living materials fabricated via gradient mineralization of light-inducible biofilms[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(3): 351-359.
- [129] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.

- [130] SEFIK E, ISRAELOW B, MIRZA H, et al. A humanized mouse model of chronic COVID-19[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(6): 906-920.
- [131] YE C Y, QI L N, WANG J, et al. COVID-19 pandemic: advances in diagnosis, treatment, organoid applications and impacts on cancer patient management[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8: 606755.
- [132] CHEN D, SU X, CHEN H B, et al. Human organoids as a promising platform for fighting COVID-19[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(3): 901-910.
- [133] HAN Y L, DUAN X H, YANG L L, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids[J]. *Nature*, 2021, 589(7841): 270-275.
- [134] EBISUDANI T, SUGIMOTO S, HAGA K, et al. Direct derivation of human alveolospheres for SARS-CoV-2 infection modeling and drug screening[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(10): 109218.
- [135] PARK J W, LAGNITON P N P, LIU Y, et al. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(6): 1446-1460.
- [136] JAHANSHAHLU L, REZAEI N. Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 129: 110337.
- [137] MOOSAVI B, MOUSAVI B, YANG W C, et al. Yeast-based assays for detecting protein-protein/drug interactions and their inhibitors[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2017, 96(6): 529-541.
- [138] 郑美云, 李妙君, 沈国婴, 等. 用酵母双杂交系统筛选抗人 p53 单链抗体[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(1): 112-117. ZHENG M Y, LI M J, SHEN G Y, et al. Screening of special scFv antibody against human p53 protein by yeast two-hybrid system[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2016, 32(1): 112-117.
- [139] ROZENBLATT-ROSEN O, REGEV A, OBERDOERFFER P, et al. The human tumor atlas network: charting tumor transitions across space and time at single-cell resolution[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 236-249.



通讯作者: 肖国芝(1963—),男,教授,乌克兰国家工程院外籍院士。主要研究方向是骨骼发育和疾病的相关分子基础。

E-mail: xiaogz@sustech.edu.cn



通讯作者: 林荔军(1976—),男,博士,主任医师,博士生导师。主要从事合成生物学与骨科疾病诊治领域方面的研究,利用合成生物学方法构建新型材料用于骨关节炎、骨折不愈合等骨科多发疾病的治疗,研究方向为骨关节炎发病分子机制研究、骨肉瘤侵袭和转移的分子机制研究、骨组织3D打印和生物力学研究。

E-mail: gost1@smu.edu.cn



第一作者: 吴晓昊(1991—),男,博士研究生。研究方向为骨关节稳态和疾病发生的分子机制。

E-mail: wxho0606@163.com



第一作者: 廖荣东(1996—),男,博士研究生。研究方向为骨科疾病的发病机制。

E-mail: lrxyxs12138@163.com