



CRISPR/Cas9 系统:构建非人灵长类 动物疾病模型的新技术

杨伟莉,涂著池,李晓江

(中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101)

【摘要】 动物疾病模型在研究人类疾病致病机理和药物筛选中起到了关键作用。非人灵长类动物由于与人类更为接近,在探究人类神经退行性疾病、神经精神疾病及人类认知功能、神经环路等方面具有巨大的优势可成为研究和药物筛选的重要疾病模型。然而,由于缺乏大动物的胚胎干细胞系,传统的基因打靶技术难于用来建立灵长类动物疾病模型。最近发展的基因编辑新技术 CRISPR/Cas9 系统在定向对基因进行修饰上展现出了巨大的潜力。本文将介绍 CRISPR/Cas9 技术的发展和應用,以及非灵长类动物作为神经退行性疾病模型的优势和意义。

【关键词】 CRISPR/Cas9 系统;非人灵长类动物;神经退行性疾病

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.016

CRISPR/Cas9 system: a new gene modification tool for establishing disease models in non-human primates

YANG Wei-li, TU Zhu-chi, LI Xiao-jiang

(State Key Laboratory of Molecular Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】 Animal models are highly valuable systems that have been extensively used to elucidate human disease pathogenesis and to find therapeutic ways to treat human diseases. Since non-human primates are close to humans, monkeys are important model species in exploring the mechanisms and treatment of human neurodegenerative diseases, neuropsychiatric disorders, cognitive function, and neural circuits. However, due to the lack of embryonic stem cell lines in large animals, the traditional gene targeting technology is difficult to establish primate animal models of human diseases. CRISPR/Cas9, as a recently developed tool for genome modifications, has been successfully used to target genomic loci in mouse, rat, monkey, and other species. Here, we discuss the utilization of CRISPR/Cas9 technology in establishing monkey models for studying human neurodegenerative diseases.

【Key words】 CRISPR/Cas9 system; Non-human primates; Neurodegenerative diseases.

神经退行性疾病是由神经元或其髓鞘的丧失所致,随着年龄老化而恶化,导致功能障碍,如肌肉萎缩性侧索硬化症、额颞叶痴呆、老年性痴呆阿尔

茨海默症、亨廷顿舞蹈症、帕金森症等。随着人类生活水平的提高与寿命的延长,老年人比例不断增加,神经退行性疾病逐渐增多,也越来越受到社会

【基金项目】 科技部国家重大科学研究计划项目(课题编号:2012CBA01304)和分子发育生物学国家重点实验室经费资助。

【作者简介】 杨伟莉(1987-),研究生,主要研究方向:神经退行性疾病,E-mail: weiliyang@genetics.ac.cn。

【通讯作者】 李晓江(1957-),研究员,主要研究方向:神经退行性疾病,E-mail: xjli@genetics.ac.cn

的关注。然而,该类疾病大多发病机制尚不明确,无有效的治疗措施。因此,要筛选和检测出有效的药物和治疗方法,成功建立出能够模拟出人类神经退行性疾病症状的有效动物模型成为关键。非人灵长类动物和人类在遗传学基础上和生理病理上高度相似,被公认为是理想的疾病研究动物模型。基因组编辑技术在疾病模型建立过程中发挥了重要作用,尤其是最新发现的 CRISPER/cas9 技术因简单、方便且能够精确的对基因进行修饰,使得用 CRISPER/cas9 技术建立基因修饰猴来模拟人类重大疾病成为可能。

1 CRISPR/Cas9 系统

建立动物模型的基因编辑方法主要有转基因和基因打靶。转基因即用人造方法将外源基因导入或整合到基因组内,并能够稳定传给下一代。动物转基因技术的操作方法主要有显微注射法,胚胎干细胞法和逆转录病毒感染法等。转基因技术的发展在生物医学研究及农业生产中发挥了相当重要的作用。而基因打靶技术是指通过内源性 DNA 定点重组,改变基因组中的某一特定基因从而在生物活体内研究该基因的功能,包括基因敲除和敲入^[1]。传统的基因打靶技术依赖于胚胎干细胞系,首先在胚胎干细胞系中进行基因打靶,然后移植打靶后的胚胎干细胞入动物母体,让其发育成带有突变基因的动物。由于缺乏大动物的胚胎干细胞系,此传统的基因打靶技术难于用来建立灵长类动物疾病模型。最近发展的定向基因组编辑方法 CRISPR/Cas9 技术能在胚胎细胞中直接打靶,已广泛用于不同种属中来进行基因组改造和基因修饰。

CRISPR/Cas9 是一种来源于细菌获得性免疫的由 RNA 指导 Cas 蛋白对基因进行编辑和修饰的新技术。早在 1987 年,日本大阪大学(Osaka University)在对一种细菌编码的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)基因进行研究时,发现该基因编码区域附近存在一小段不同寻常的 DNA 片段,这些片段由简单的重复序列组成,而且在片段的两端还存在一段不太长的特有序列,并在 2002 年正式命名为 CRISPR 序列^[2]。CRISPR,或称为规律成簇间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一个特殊的 DNA 重复序列家族,广泛分布于细菌和古菌基因组中的重复结构^[2,3]。CRISPR 位点通常由高度保守的短重复序

列(repeats)组成,重复序列之间被间隔序列(spacer)隔开。在 CRISPR 位点附近,存在一系列 CRISPR 相关(CRISPR-associated, Cas)基因,如图 1^[29]。研究表明,CRISPR 与一系列相关蛋白、前导序列一起构成一套保守且完整的系统,为原核生物提供对抗噬菌体等外源基因的获得性免疫能力^[4]。

CRISPR/Cas9 作为细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御,可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA。即:当噬菌体入侵细菌时,Cas 蛋白复合物靶向并裂解噬菌体基因组中短的原型间隔序列(proto-spacer),该序列是与 CRISPR 间隔序列同源的噬菌体基因序列,然后这些原型间隔序列整合到 CRISPR 位点的 5'端^[5],随后这些间隔序列被转录成 crRNAs(CRISPR RNAs),当噬菌体再次被噬菌体感染时,crRNAs 作为模板靶向噬菌体的原型间隔序列并利用 cas 蛋白进行切割,从而对抗外源基因的入侵^[6]。Jinek 等对 CRISPR/Cas9 系统进行改造,将 crRNA 和 tracrRNA2 个序列通过一个四碱基的连接环连接起来,构成一个新的向导 RNA,相对于野生型的 CRISPR/Cas9 系统(如图 2)^[7],这种新型的系统更加容易构建并具有相同的打靶效率^[7]。Cas9 内切酶在向导 RNA 分子的引导下对特定位置的 DNA 进行切割,形成双链 DNA 缺口,然后细胞会借助同源重组机制或者非同源末端连接机制对断裂的 DNA 进行修复。若细胞通过同源重组机制进行修复,会用另外一段 DNA 片段填补断裂的 DNA 缺口,因而会引入一段“新的”遗传信息。最近多项研究都表明,RNA 介导的 Cas9 系统能够成功介导细菌、小鼠细胞、斑马鱼胚胎、人类细胞、植物细胞、非人灵长类动物食蟹猴胚胎等的基因组编辑^[7-13](图 3)^[7-13,17]。Rudolf Jaenisch 等利用该技术成功构建了同时携带多个基因突变的小鼠^[14]。中科院李劲松研究组设计出一种引导 Cas9 结合到一个发生单碱基突变的等位基因上的向导 RNA,在这种等位基因上,Cas9 能够切割发生突变的 DNA 序列。他们将野生型等位基因或寡核苷酸注射到发生单碱基突变的小鼠受精卵中,能够校正发生突变的等位基因,得到了无白内障小鼠^[15],这是首次在完整动物中利用 CRISPR 系统纠正致病的突变基因从而治疗疾病。与此同时,Hans Clevers 研究组通过 CRISPR/Cas9 以及一个包含插入修补序列的供体质粒在人类干细胞中纠正了与囊性纤维化有关的缺陷,成功培育出了功能正常的微型

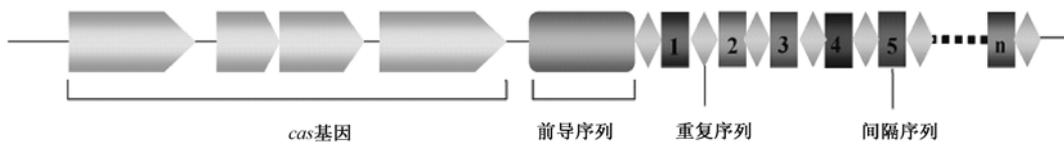


图 1 CRISPR 位点结构^[29]

Fig.1 The structure of CRISPR System^[29]

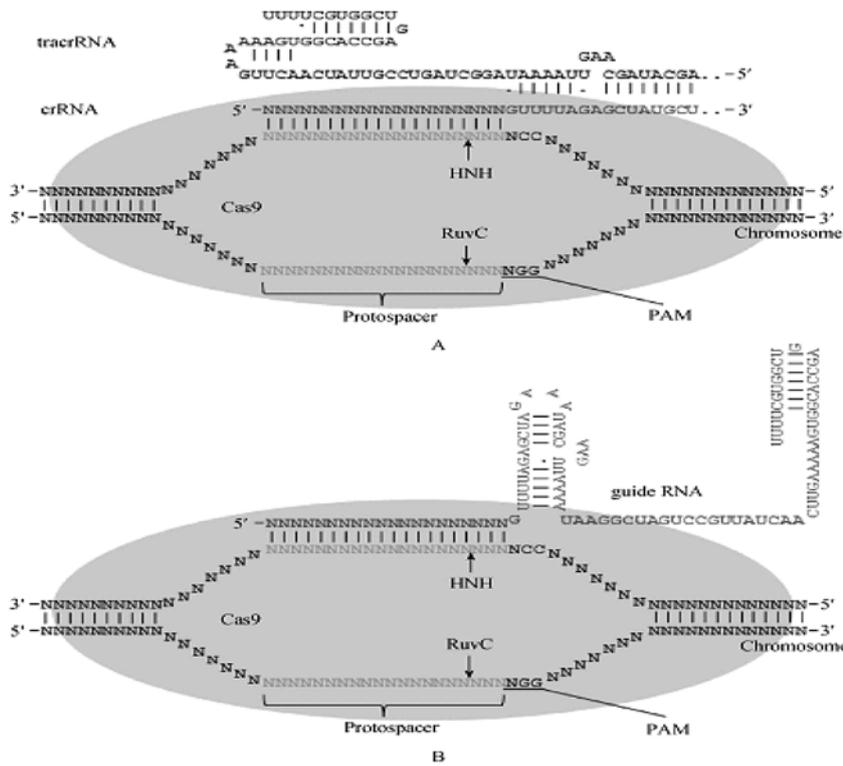


图 2 CRISPR/Cas9 系统的模式图^[7]

Fig.2 Schematic of CRISPR/Cas9 mediated DNA double-strand break^[7]

肠^[16]。他们的研究为未来该技术用于人类遗传缺陷疾病的治疗提供了希望。

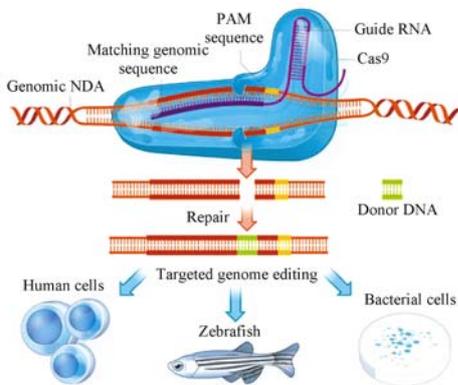


图 3 RNA 介导的 Cas9 系统定向^[17]基因组修饰作用机制示意^[17]

Fig.3 Targeted genome editing with RNA-guided Cas9^[17]

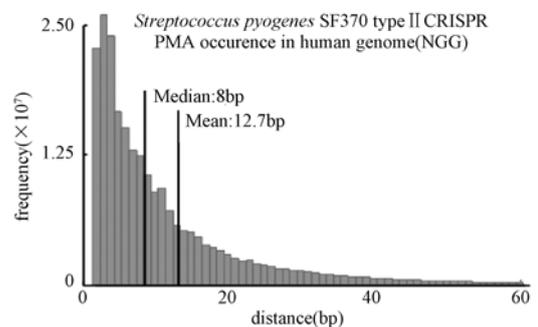


图 4 PAM 序列在人类基因组中出现频率统计^[8]

Fig.4 The frequency statistics of PAM in the human genome sequence^[8]

CRISPR/Cas9 作为一种新的基因打靶技术,在构建和使用简单、方便,只需要靶序列的 3' 端含有 PAM 区即 NGG,而在人类基因组中每 8 bp 就会

出现一个 PAM 区^[8],如图 4。利用该技术能够实现多基因敲除、敲入或特异性干扰调控,为研究基因的功能、互作及调控网络机制提供了便利,而其高效的打靶效率也为改变与特定疾病相关的基因从而为修复人类缺陷基因、建立人类重大疾病模型、小分子药物的靶向治疗和定点修复、动植物育种等提供新的途径。

2 非人灵长类动物疾病模型的优势

目前,人类遗传疾病模型的研究主要集中在果蝇、线虫、斑马鱼、小鼠、大鼠等小动物模型上,这些小动物在研究神经退行性疾病发病机理上发挥了重要的作用^[18, 19]。但是这些小动物模型并不能完全模拟人类疾病的病理变化和症状,如多数转基因小鼠的神经退行性疾病(AD、PD 和 HD)模型并不出现明显的神经元细胞死亡^[20-22]。此外,这些小动物寿命较短(如小鼠最多生存 2~3 年),细胞器官发育,衰老过程及寿命具有种属差异性,如表 1。尤其在自闭症、精神分裂症及老年痴呆等神经系统疾病的研究中,难于用小鼠模型来检查灵长类动物所具备的复杂的认知能力和社交能力。而且,很多治疗神经系统疾病的药物在小鼠模型上发挥作用却在人类临床试验中失败^[23]。目前,用小鼠及其它小动物模型尚未找到有效治疗神经退行性疾病的方法及药物。因此,种属差异可能对神经退行性疾病病理变化影响甚大。

而非人灵长类动物(如猕猴、食蟹猴等)在生物学上与人类高度相似。2011 年,我国科学家完成了食蟹猴和恒河猴基因组的比较分析^[24]。猕猴与人类基因组同源性高达 93%^[25],且猕猴大脑在解剖学上与人类有着极高的相似性,提示我们用灵长类动物建立疾病模型的重要性。早在 2000 年,研究人员将携带有绿色荧光蛋白 GFP 编码基因的病毒载体送入猴卵细胞里,得到了世界上第一只人工遗传改造的猴——ANDi^[26],证实了建立转基因灵长类动物模型的可能性。随后, Yang 等利用类似病毒载体注射受精卵的方法在 2008 年建立了携带有人突变亨廷顿基因的转基因猴模型,该人工修饰的转基因猴模型能够模拟出 HD 患者的多种主要临床症状,如舞蹈病、抽搐及肌张力障碍,从而证明了首例人类疾病的灵长类动物模型的建立。此外,转基因小猴中出生不久就表现出比小鼠模型更严重的症状和早期死亡^[27]。这些转基因猴疾病模型的成功

建立都表明了非人灵长类动物在研究人类遗传性疾病的发病机理上具有重要的医学价值。

但是依赖于病毒方法对灵长类动物进行遗传学修饰也有一定的局限性,即被转入基因的随机插入使得突变位点无法预知,突变数量无法控制,从而限制了动物模型的建立。而 CRISPR/Cas9 系统作为最新的基因定向编辑技术在建立大动物模型上具有巨大的潜力,且该技术无需胚胎干细胞,将不再局限于有限种类的模式生物。最近, Niu 等研究人员利用显微注射方法将 CRISPR/Cas9 系统中的 RNA 注射到猴单细胞胚胎中,证明该系统对食蟹猴基因组也能进行基因修饰^[12]。于此同时,世界上的其他科学家也正利用该技术开展灵长类动物疾病模型建立的工作^[28]。虽然目前用灵长类动物研究 CRISPR/Cas9 的基因修饰功能还仅限于基因组 DNA 突变的检测,可以预测 CRISPR/Cas9 的基因修饰功能将使灵长类动物成为我们研究重大神经系统疾病的发病机制及疾病的早期干预和药物筛选的重要动物模型。

世界上共有约 400 余种灵长类动物,应用于生命医学研究最常用的灵长类动物是猕猴和食蟹猴。美国等发达国家由于宗教、伦理、经济等因素,使得灵长类的研究遇到了困难。而中国是灵长类动物资源丰富的国家之一,对灵长类动物的研究方面则存在许多优势。

目前,利用灵长类动物建立基因修饰动物模型仍然面临巨大挑战。首先,阳性胚胎打靶率和移植的成功率有待于提高,尤其是考虑到灵长类动物生殖周期与繁殖期长,动物费用高等因素。其次,目前所报道的基因修饰猴存在嵌合多态性和非单点基因突变的不足之处,是否动物身体所有细胞都具有同样的基因修饰仍待证实^[12]。因此,优化阳性胚胎打靶率和移植的成功率是建立灵长类动物模型的关键。

表 1 动物种属间的重要生物特性差别
Tab. 1 Biological characteristics of differences between animal species

种属	性成熟期	妊娠期 (天)	平均寿命 (年)	平均体重 (千克)
人类	15~18 年	256	75	50
猕猴	3~5 年	165	25	6
猪	9~11 月	114	7	80
鼠	7 周	19~21	2	0.03

3 展望

基因编辑新技术 CRISPR/Cas9 系统的飞速发

展使得动物疾病模型的建立不再局限于少数的模式生物,使得在所有物种中实现基因组编辑成为可能。该技术使用方便、简单且打靶效率较高,但同时也存在潜在脱靶效应、在胚胎不同阶段的多次打靶使得基因编辑具有嵌合多态性等缺陷性。在未来的研究中,如何改进该技术的脱靶效应和基因打靶的时空效应以避免突变多态性将是关键问题。由于灵长类动物在神经系统、代谢系统和免疫系统上与人类具有高度的相似性,而且我国灵长类动物资源丰富,利用先进的基因编辑技术 CRISPR/Cas9 系统构建人类重大神经系统退行性疾病的灵长类动物模型将是未来生物医学研究发展的趋势,同时也是我国生命科学研究的优势和发展机遇。

参考文献:

- [1] 卢丽,陈系古,黄冰. 基因敲除动物的研究和应用 [J]. 中国实验动物学报, 2006,14:152-156.
- [2] Jansen R, Embden J, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. Mol Microbiol, 2002,43:1565-1575.
- [3] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. Microbiology, 2005,151:653-663.
- [4] Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea [J]. Mol Cell, 2010, 37:7-19.
- [5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007,315:1709-1712.
- [6] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. Science, 2008,321: 960-964.
- [7] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells [J]. Elife, 2013,Jan 29;2:e00471.
- [8] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013,339:819-23.
- [9] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013,339:823-826.
- [10] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. Nature Biotechnol, 2013, 31:230-232.
- [11] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. Nature Biotechnol, 2013,31:686-688.
- [12] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. Cell, 2014. [http://dx. doi. org/ 10.1016/j. cell.2014.01.027](http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027)
- [13] 马元武,张连峰. 利用 CRISPR/Cas9 技术实现快速、经济的大鼠条件基因敲除技术 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 3:015.
- [14] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Cell, 2013, 153(4):910-918.
- [15] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. Cell Stem Cell, 2013, 13:659-662.
- [16] Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients [J]. Cell Stem Cell, 2013,13:653-658.
- [17] Charpentier E, Doudna JA. Biotechnology: rewriting a genome [J]. Nature, 2013,495:50-51.
- [18] Bilen J, Bonini NM. Drosophila as a model for human neurodegenerative disease [J]. Annu Rev Genet, 2005,39:153-171.
- [19] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view [J]. Nature Rev Genet, 2007,8:353-367.
- [20] Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease [J]. Neuron, 2010,66:646-661.
- [21] Wirths O, Bayer TA. Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. Int J Alzheimer's Dis, 2010,(2010), Article ID 723782.
- [22] Ribeiro FM, Camargos ERdS, Souza LCd, et al. Animal models of neurodegenerative diseases [J]. Revista Bras Psiquiatr, 2013,35(Suppl 2):S82-S91.
- [23] Shen H. Precision gene editing paves way for transgenic monkeys [J]. Nature, 2013,503:14-15.
- [24] Yan G, Zhang G, Fang X, et al. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques [J]. Nature Biotechnol, 2011,29:1019-1023.
- [25] Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, et al. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome [J]. Science, 2007,316:222-234.
- [26] Chan A, Chong K-Y, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes [J]. Science, 2001,291:309-312.
- [27] Yang S-H, Cheng P-H, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate [J]. Nature, 2008,453:921-924.
- [28] Pennisi E. Editing of targeted genes proved possible in monkeys [J]. Science, 2014,343:476-477.
- [29] 李铁民,杜波. CRISPR-QS 系统与细菌和噬菌体的共进化 [J]. 遗传,2011,33:213-218.

[修回日期]2014-06-23