

CRISPR/Cas 系统在神经系统研究中的应用的研究进展

何征晖¹ 综述 汪泱² 审校

1. 上海交通大学附属第六人民医院临床医学院,上海市 200233

2. 上海交通大学附属第六人民医院四肢显微外科研究所,上海市 200233

摘要: CRISPR 技术在神经干细胞基因编辑中的可行性已通过相关靶向基因编辑实验得到证实。根据这些实验结果,可以认为 CRISPR 在未来神经再生和神经系统疾病治疗等领域具有巨大价值。本综述介绍了 CRISPR 基因编辑技术的原理及其优势和劣势,以及利用 CRISPR 技术针对帕金森病和亨廷顿病的相关基因研究,以此来探讨 CRISPR 在神经系统疾病建立疾病模型和基因治疗等领域的应用前景。

关键词: CRISPR - Cas 系统;神经干细胞;中枢神经系统疾病;基因编辑

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2018.04.023

CRISPR/Cas-9 系统是目前新兴的一种基因编辑技术。相比传统基因编辑技术,因其具有更精确、更高效和更简洁的特点,所以成为了目前基因研究的一项热门技术。在其他领域,如遗传病和血液病等,有不少关于 CRISPR 技术在全类干细胞及各种疾病中研究的报道,但在神经系统领域中,使用 CRISPR 技术的研究却并不多见。那么,CRISPR 技术能否应用于神经干细胞的靶向基因编辑?在靶向基因编辑技术的基础上,能否针对神经系统相关疾病建立基因模型?能否在临床应用于基因治疗?本文将通过介绍 CRISPR 技术在神经系统领域中的研究进展,来解答以上问题。

1 CRISPR/Cas 系统介导的基因编辑技术

1.1 CRISPR/Cas 系统的介绍

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 系统是细菌在长期演化过程中形成的针对病毒或外源基因整合的适应性免疫防御。它通过短 RNA 靶向降解外源基因,来对抗外源基因的整合,这种现象被称为 CRISPR 干扰^[1]。目前 CRISPR/Cas 系统可分为五大类^[2]。其中 I 型、III 型和 IV 型需要依赖多种 Cas (CRISPR associated) 蛋白形成复合体来切割基因,而 II 型和 V 型只需要一种蛋白进行切割。由于 II 型 CRISPR 系统借助的

Cas-9 蛋白具备上述的靶向性与独立性,使得此系统在基因靶向编辑中,具有巨大的潜力与应用空间。

2013 年 2 月, Mali 等^[3] 在人的胚胎细胞中,利用引导 RNA (gRNA) 协同的 II 型 CRISPR 系统,对 AAVS1 区的基因进行编辑。结果表明,CRISPR 技术具有序列特异性,且可以通过引入多种 gRNA 来对目标区域进行多重编辑。这项发现为人类基因工程研究提供了一种新的技术方向。

1.2 CRISPR/Cas 系统的技术优劣

CRISPR 系统介导的基因编辑技术问世之后, Ding 等^[4] 首先在诱导多能干细胞的基因编辑中比较了 TALEN 技术与 CRISPR 技术的区别。他们发现,借助 Cas-9 蛋白的高表达性和耐受性,以及此蛋白本身具有的 DNA 解旋能力,CRISPR 技术在诱导多能干细胞的基因编辑中比传统 TALEN 技术更易操作。并且,相较于传统基因编辑技术存在的细胞毒性问题,CRISPR 技术更安全稳定^[5]。

Kuscu 等^[6] 发现 Cas-9 蛋白脱靶效应的程度取决于协同它的 gRNA 差异。Kim 等^[7] 的研究表明,设计合理的 gRNA 来进行编辑,的确可以使脱靶效应最小化。Veres 等^[8] 利用 CRISPR 技术及 TALEN 技术来进行人体多能干细胞的基因编辑。这两种技术在结

收稿日期:2017-10-24;修回日期:2018-04-03

作者简介:何征晖(1995-),男,上海交通大学医学院本科在读生,临床五年制专业。

通信作者:汪泱(1963-),女,博士,研究员,副所长,主要从事干细胞与再生医学方面的应用基础研究。

果中并未出现明显的脱靶效应。学者们认为,尽管对于各类型细胞的基因编辑存在着脱靶可能,但这种发生率在人体多能干细胞中可能非常小,因此,可以成为一种避免脱靶效应的实验设计。

1.3 CRISPR/Cas 系统的相关应用

由于 CRISPR/Cas 系统的优秀特性,该技术被应用于构建各种疾病模型之中。Mizuno 等^[9]通过 CRISPR/Cas-9 系统来得到 G291T 突变的白化病小鼠。在 60 个样本中,有 11 只小鼠在 G291T 位点发生了单核苷酸突变,17 只小鼠在位点附近存在突变,而且这种突变可以遗传给后代。这个结果表明,CRISPR 技术在用于建立特定的疾病模型中有巨大潜力。

此外,CRISPR 技术的精确性使得其可以用于疾病的基因治疗。Xie 等^[10]尝试利用 CRISPR 与 piggyBac 技术来治疗 β -地中海贫血。在将患者的诱导多能干细胞基因修正后,体外培养分化成红细胞,而这种红细胞具有表达血红 β 珠蛋白的能力,这表明该基因疗法可以有效治疗地中海贫血。由此,证实了 CRISPR 技术用于基因治疗的可行性。

2 CRISPR 技术在神经干细胞研究中的应用

2.1 神经干细胞研究的进展与困境

1992 年,Reynolds 等从胎鼠和成鼠纹状体中分离得到神经干细胞,打破了之前人们认为神经组织不可再生的观念。利用神经干细胞的自我分化与增殖能力,人们对于神经系统疾病如帕金森和脊髓损伤等有了新的治疗方向。2006 年,Shinya 等发现诱导多能干细胞后,使神经干细胞的来源不再局限于神经组织。这使神经干细胞的研究与应用又向前迈了一大步。

神经干细胞的体外培养证实,其在探索细胞分子调节机制、神经组织工程以及中枢神经系统疾病模型的研究中具有丰富的价值^[11]。神经干细胞被证实可以通过直接移植来直接修复受损组织,或通过分泌细胞因子刺激组织再生,来间接修复损伤^[12]。对神经干细胞诱导分化的相关研究,发现可以通过对生长因子和细胞因子的调节,来激活内源性神经干细胞而起到修复治疗的作用。在基因层面,神经干细胞已被用于转录组分析、基因测序以及基因筛查等研究中^[13-15]。虽然神经干细胞的研究获得了大量的成果,但针对神经干细胞的靶向基因编辑仍鲜有报道。对于大多数体细胞的靶向基因编辑,都是利用同源重组的原理来完成,而由

于同源重组的低效率,导致神经干细胞的基因靶向研究十分困难。因此寻求一种可用于神经干细胞的高效精确靶向基因技术成为了难题。

2.2 在神经干细胞基因编辑中的应用

Kalebic 等^[16]利用 CRISPR/Cas-9 系统,在活体内破坏敲入了 Tis21::GFP 基因的小鼠的基因,在 2 d 后发现约 90% 的靶细胞绿色荧光蛋白表达被消除。另外,他们还通过显微注射的方式将 Cas-9 蛋白与 gRNA 的复合物注入脑片培养的神经干细胞中,在细胞单个生长周期内破坏了绿色荧光蛋白的表达。

Bressa 等^[17]尝试使用 CRISPR/Cas-9 系统来进行针对人和鼠神经干细胞的一系列基因操作。在靶向基因插入的实验中,研究者在鼠 Rosa26 区和人 AAVS1 区插入一段表达绿色荧光蛋白的基因序列。两种神经干细胞均可顺利培养,并表达绿色荧光蛋白。在等位基因破坏的实验中,研究者在鼠的神经干细胞中用一段荧光蛋白基因破坏了转录调控因子 Olig2 的表达基因。通过免疫荧光标记显示,约 25% 被破坏的细胞不表达 Olig2 蛋白,T7EI 检测显示约 40% 被破坏的细胞基因操作位点发生突变。这些实验论证了 CRISPR/Cas-9 系统在体外培养的神经干细胞中的可行性,对于神经干细胞基因操作的进一步研究具有重要价值。此外,研究者利用 CRISPR/Cas-9 系统,可以成功将 Sox2-mCherry 荧光基因敲入神经干细胞,得到相应的荧光反应细胞。通过荧光基因产物的测定,可以用于检测某种特定基因产物的基因定位。结合 CRISPR 技术,可以用于神经干细胞基因的荧光示踪。

综上所述,体内和体外的实验结果均证实了 CRISPR 技术可以为神经干细胞的研究提供一种高效精确的靶向基因技术,这也将推动与神经干细胞相关的神经再生医学、神经病治疗等领域研究。

3 CRISPR 技术在神经系统疾病中的应用

3.1 在疾病相关基因上的应用

Rubio 等^[18]尝试利用 CRISPR/Cas-9 系统在干细胞中针对神经系统疾病相关基因 TSC2 与 KCNQ2 进行靶向灭活。TSC2 的突变与结节性脑硬化相关,KCNQ2 基因常与家族性先天性癫痫有关^[19,20]。研究者通过在人多能干细胞中将目的基因靶向灭活,并将其体外培养分化为神经细胞,然后检测目的基因在分化后的细胞内表达与突变程度。实验结果表明,靶向基因灭活的效率达 85%。

研究者还通过设计一种表达 CRISPR 成分的神源性因子,可以使培养分化的神经细胞在五周内得到特定基因编辑。这些结果不仅证实了 CRISPR 技术可以简单快速地进行基因编辑,而且也可以用于一些神经系统疾病的基因治疗之中。

3.2 在帕金森病研究中的应用

帕金森病是非常常见的老年神经退行性运动障碍疾病。尽管这种疾病的发病是随机的,但对于病人的基因测序,不断证实这种疾病存在一些特定基因位点的突变^[21]。

有研究表明,PARK2 与 PINK1 基因的功能退化会导致帕金森病的发生^[22,23]。那么利用 CRISPR/Cas-9 系统来介导突变,导致 PARK2 或 PINK1 的缺失,就可以模拟帕金森病患者的基因退化。同时,由于 CRISPR/Cas-9 系统可以同时在一个细胞中进行多重编辑,使得 PARK2 和 PINK1 同时缺失成为了可能。Zhou 等^[24]利用 CRISPR/Cas-9 系统成功得到了 20 只 PARK2 和 PINK1 双基因敲除的实验猪。此后,Wang 等^[25]尝试利用 CRISPR/Cas-9 系统在猪身上建立帕金森病疾病模型,研究者针对 PARK2、DJ-1 和 PINK1 这 3 个基因位点进行编辑,得到了一只 3 个位点均显示双等位基因修饰的小猪,与一只两个位点双等位修饰和一个位点单等位修饰的小猪。

这些成功的动物模型建立有望在将来揭示 PARK2 和 PINK1 等与帕金森病相关基因退化的机制,而且提示了 CRISPR 技术在建立疾病模型上的可行性。

3.3 在亨廷顿病研究中的应用

与帕金森病类似,亨廷顿病也是一种因神经退行性病变而导致的功能障碍疾病。研究表明,亨廷顿病是由于 HTT 中 CAG 重复序列的扩增所导致。Kolli 等^[26]利用两种 CRISPR/Cas-9 质粒,使亨廷顿病相关基因位点沉默,从而建立亨廷顿病的体外模型。研究者的结果表明,通过针对上游开放阅读框(upstream open reading frame, uORF)的破坏对于 HTT 的转录没有影响,而在内显子 1 与外显子交界的破坏,可以影响 HTT 的转录。

Xu 等^[27]尝试通过 CRISPR/Cas-9 系统结合 piggyBac 技术,在亨廷顿病患者的诱导多能干细胞中进行基因修正。携带亨廷顿病基因的干细胞与修正后的干细胞均分化为有突触活性的脑神经细胞。通过两者对比,携带亨廷顿病基因的干细胞培养得

来的神经细胞,存在着神经丛形成受损、缺乏生长因子后易受损和线粒体代谢受损等异常,而这些问题可以通过基因控制的方式,在修正后的细胞中没有产生。这表明,CRISPR 技术或许能用于亨廷顿病的基因治疗中。

4 结语

自 2013 年 CRISPR 系统介导的基因编辑技术问世以来,就立刻成为了细胞基因研究的热点。由于其比传统 ZFN 及 TALEN 技术更高效、精确和易操作,并且可以多重基因编辑,因此,为许多以前无法进行的复杂基因操作研究提供了技术,从而证实了许多基因位点的突变的作用。在神经系统的研究领域,CRISPR 技术为复杂的神经细胞基因研究这个难题提供了新的途径。利用此技术,我们可以从基因层面建立疾病模型,研究并解释神经系统疾病的发病机制。并且借助其精准高效特性,在神经系统疾病的基因治疗研究中也具有相当大的应用前景。尽管 CRISPR 技术在神经系统研究中取得了不小的成果,但仍存在问题有待解决。比如,CRISPR 技术已证实具有两至三个基因的编辑能力,那么能否建立更多基因位点突变的疾病模型?如果 CRISPR 技术可以针对更多位点进行编辑,那是否会有存在更大的脱靶效应?等等,都是值得进一步研究和探讨的问题。

参 考 文 献

- [1] Dhawan M, Sharam M, Grewal RS. CRISPR Systems: RNA-Guided Defence Mechanisms in Bacteria and Archaea [J]. Int J Curr Microbiol App Sci, 2015, 4(6): 187-200.
- [2] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(11): 722-736.
- [3] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339(6121): 823.
- [4] Ding Q, Regan SN, Xia Y, et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(4): 393-394.
- [5] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus [J]. Sci Reports, 2013, 3(8): 2510.
- [6] Kuscu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9

- endonuclease[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(7): 677-683.
- [7] Kim D, Kim S, Kim S, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq[J]. *Genome Res*, 2016, 26(3): 406.
- [8] Veres A, Gosis BS, Ding Q, et al. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 27-30.
- [9] Mizuno S, Dinh TT, Kato K, et al. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system[J]. *Mamm Genome*, 2014, 25(7-8): 327.
- [10] Xie F, Ye L, Chang JC, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac[J]. *Genome Res*, 2014, 24(9): 1526.
- [11] Gage FH, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain[J]. *Neuron*, 2013, 80(3): 588-601.
- [12] Yi BR, Kim SU, Kyung-Chul C. Development and application of neural stem cells for treating various human neurological diseases in animal models[J]. *Lab Anim Res*, 2013, 29(3): 131-137.
- [13] Webb AE, Pollina EA, Vierbuchen T, et al. FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis[J]. *Cell Reports*, 2013, 4(3): 477-491.
- [14] Carén H, Stricker SH, Bulstrode H, et al. Glioblastoma Stem Cells Respond to Differentiation Cues but Fail to Undergo Commitment and Terminal Cell-Cycle Arrest[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(5): 829-842.
- [15] Hubert CG, Bradley RK, Ding Y, et al. Genome-wide RNAi screens in human brain tumor isolates reveal a novel viability requirement for PHF5A[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(9): 1032-1045.
- [16] Kalebic N, Taverna E, Tavano S, et al. CRISPR/Cas9-induced disruption of gene expression in mouse embryonic brain and single neural stem cells in vivo[J]. *Embo Reports*, 2016, 17(3): 338.
- [17] Bressan RB, Dewari PS, Kalantzaki M, et al. Efficient CRISPR/Cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells[J]. *Development*, 2017, 144(4): 635.
- [18] Rubio A, Luoni M, Giannelli SG, et al. Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene inactivation in human neurons during human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming[J]. *Sci Reports*, 2016, 6: 37540.
- [19] Mi CR, Wang H, Jiang H, et al. Mutation screening of TSC1 and TSC2 genes in Chinese Han children with tuberous sclerosis complex[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 2102-2106.
- [20] Soh H, Pant R, Loturco JJ, et al. Conditional Deletions of Epilepsy-Associated KCNQ2 and KCNQ3 Channels from Cerebral Cortex Cause Differential Effects on Neuronal Excitability[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(15): 5311-5321.
- [21] Benitez BA, Davis AA, Jin SC, et al. Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 29.
- [22] Hattori N, Mizuno Y. Twenty years since the discovery of the parkin gene[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2017, 124(9): 1037-1054.
- [23] Triplett JC, Zhang Z, Sultana R, et al. Quantitative expression proteomics and phosphoproteomics profile of brain from PINK1 knockout mice: insights into mechanisms of familial Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2015, 133(5): 750-765.
- [24] Zhou X, Xin J, Fan N, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(6): 1175-1184.
- [25] Wang X, Cao C, Huang J, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Reports*, 2016, 6: 20620.
- [26] Kolli N, Ming L, Maiti P, et al. CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington's Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 754.
- [27] Xu X, Tay Y, Sim B, et al. Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(3): 619-633.