

DOI: 10.13376/j.cblls/2018114

文章编号: 1004-0374(2018)09-0950-05



孙强, 研究员, 中国科学院神经科学研究所非人灵长类(苏州)研究平台主任, 获中国科学院关键技术“百人计划”支持。孙强博士致力于非人灵长类基因修饰动物模型的构建及技术研发。他领导的团队建立了高效的非人灵长类转基因和基因敲除技术平台;首次利用体细胞核移植技术获得克隆猴;开发了食蟹猴精巢异种移植技术,大大缩短了食蟹猴的性成熟周期。作为通讯作者或第一作者在 *Cell*、*Nature*、*PNAS*、*Nature Communication*、*Cell Research* 等著名学术期刊发表多篇研究论文。其作为通讯作者在 *Nature* 发表的具有自闭症表型的转基因食蟹猴的工作被科技部评为“2016 中国科学十大进展”。

## 非人灵长类基因修饰模型构建技术研究进展

刘 真, 廖兆蒂, 孙 强\*

(中国科学院神经科学研究所, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心,  
神经生物学国家重点实验室, 中国科学院灵长类神经生物学重点实验室, 上海 200031)

**摘 要:** 随着以 CRISPR-Cas9 为代表的新型基因编辑技术的出现及发展应用, 科学家们在构建非人灵长类基因修饰模型方面取得了很多重要进展。然而, 首建动物嵌合、复杂基因修饰低效、传代周期长以及遗传背景复杂等多方面因素极大地限制了非人灵长类基因修饰模型的开发和应用。现对目前非人灵长类基因编辑模型构建的进展进行综述, 并重点对基因编辑技术结合体细胞核移植、精原干细胞、胚胎干细胞及单倍体干细胞等技术手段在非人灵长类基因修饰模型构建中的进展进行综述和展望。

**关键词:** 基因编辑; 非人灵长类; 体细胞核移植; 干细胞

**中图分类号:** Q78; Q-3      **文献标志码:** A

## Advance of technologies in generating gene-modified non-human primates

LIU Zhen, LIAO Zhao-Di, SUN Qiang\*

(State Key Laboratory of Neuroscience, Key Laboratory of Primate Neurobiology, CAS Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Institute of Neuroscience, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract:** With the recently developed gene-editing methods, such as CRISPR-Cas9, significant progresses have been achieved in the generation of gene-modified non-human primates (NHP). However, the development and application for gene-modified NHP are still limited due to mosaicism in founder animals, low efficiency in complex gene modification, long sex mature time in passage and complicated genetic background. Here we first review the recent achievements in the generation of gene-modified NHP. Then, we focus the development and advantage of somatic cell nuclear transfer, spermatogonia stem cell, embryonic stem cell and haploid stem cell in the generation of gene-modified NHP models.

**Key words:** gene editing; non-human primates; somatic cell nuclear transfer; stem cell

收稿日期: 2018-05-21; 修回日期: 2018-08-02

基金项目: 江苏省科技厅(2014BA103B00)

\*通信作者: E-mail: qsun@ion.ac.cn; Tel: +86-13636374295

近年来, CRISPR-Cas9 等新型基因编辑技术在多个学科领域得到了广泛的应用。其中, 该技术的发展和應用对基因修饰动物模型构建领域的影响和意义尤其显著。利用 CRISPR-Cas9 等技术构建大小鼠等动物模型, 可极大地缩短模型构建的实验周期和成本费用<sup>[1-2]</sup>。重要的是, 利用此技术首次实现了对非人灵长类进行精准的基因编辑, 这使得构建精确基因修饰非人灵长类动物模型成为了可能。2014年, 来自昆明理工大学和中科院神经所为主的两个团队分别通过受精卵注射靶向食蟹猴 *Mecp2* 基因的 TALEN 质粒和 mRNA, 得到了 *Mecp2* 基因突变食蟹猴<sup>[3-4]</sup>。紧接着, 昆明理工大学团队又使用 CRISPR/Cas9 技术获得了携带多个基因突变的基因编辑食蟹猴, 之后又有多个基因编辑猴在中国多家实验室成功获得<sup>[5-8]</sup>。2016年, 日本科学家利用 ZFN 和 TALEN 成功获得了 *IL2RG* 基因编辑绒猴<sup>[9]</sup>。2017年, 同样是来自于昆明理工大学和中科院神经所为主的两个团队同时报道利用 CRISPR-Cas9 技术获得了 OCT4-GFP 和 Actin-Cherry 的基因敲入食蟹猴<sup>[10-11]</sup>。

尽管如此, 目前常用的受精卵胞质 RNA 注射法构建非人灵长类基因修饰模型仍然存在很多问题。首先, 首建动物嵌合, 这主要是指利用 CRISPR-Cas9 等基因编辑技术构建动物模型时, 获得的首代动物个体不同组织器官可能含有野生基因型以及不同突变基因型的现象<sup>[2]</sup>。这使得首建动物很难用于科学研究, 而利用首建动物繁殖传代获得非嵌合的 F1 代动物又面临着非人灵长类性成熟时间长, 繁殖力低下等困难<sup>[12]</sup>。其次, 复杂基因修饰困难, 主要是指在受精卵水平, 通过胞浆注射, 利用 CRISPR-Cas9 等基因编辑技术使外源片段通过同源重组精确插入到目的基因组, 进而获得外源片段精确插入的阳性动物的效率低下。最后, 遗传背景复杂, 是指相对于生命科学研究中常用的大小鼠而言, 非人灵长类动物遗传背景个体差异性非常大, 实验结果偏差大。体细胞核移植、胚胎干细胞囊胚注射、单倍体干细胞及生殖干细胞等技术在动物模型构建方面有着其各自独特的优势。如果能将基因编辑技术与以上技术结合起来并应用到非人灵长类动物模型的构建, 则可以一定程度上克服常规受精卵胞质 RNA 注射法构建非人灵长类动物模型所带来的多项限制。

## 1 胚胎干细胞囊胚注射

胚胎干细胞囊胚注射是最经典的基因敲除动物

模型构建方法。该方法主要包括打靶载体设计和构建、胚胎干细胞同源重组和筛选鉴定、打靶胚胎干细胞囊胚注射、胚胎移植及个体检测等一系列技术环节。在靶向核酸酶技术出现之前, 该法是最常用的基因敲除小鼠模型构建方法。该方法虽然技术复杂, 周期长, 成本也非常高, 但该方法首次实现了对哺乳动物基因组的精确修饰, 对生命科学的发展做出了巨大贡献, 因此该技术的三位主要发明人马里奥·卡佩奇、马丁·埃文斯和奥利弗·史密西斯共同分享了 2007 年的诺贝尔生理或医学奖。

最早使用的胚胎干细胞遗传背景来源是 129 小鼠, 但是科学家们最常用的小鼠模型却是 B6 遗传背景的, 所以在获得 F0 代嵌合体动物模型后, 往往需要多次同 B6 小鼠交配来实现遗传背景 B6 化, 而且此技术最初只是在小鼠中获得了成功。2008年, 剑桥大学 Austin Smith 及其同事应其龙首次提出利用两种小分子化合物 (2I, PD0325901 和 CHIR99021) 来抑制 ERK1/ERK2 和 GSK3 $\beta$  信号通路进而使小鼠胚胎干细胞维持在 “ground state” 状态<sup>[13]</sup>。利用该方法, 他们获得了来源于不同遗传背景的小鼠胚胎干细胞, 并证明了这些胚胎干细胞都可以用来获得嵌合体。更重要的是, 他们成功将此方法应用到大鼠, 建立了可以形成嵌合体和与生殖系整合的大鼠胚胎干细胞, 并用这些大鼠胚胎干细胞进行基因打靶操作和囊胚注射后得到了基因修饰的大鼠<sup>[14]</sup>。随后, 国内外多个实验室在 2I 基础上通过不断尝试新的小分子化合物组合, 探索将人和非人灵长类胚胎干细胞从传统的 “primed state” 转向 “ground state” 的培养方法, 并成功获得了具有类似大小鼠 “ground state” 性质的灵长类胚胎干细胞<sup>[15-17]</sup>。2015年, 昆明理工大学团队将培养的猴 “ground state” 的胚胎干细胞注射到正常发育的猴桑葚胚, 发现注射的胚胎干细胞可以嵌合到胚胎中发育。将嵌合的胚胎移植到受体猴中, 获得了发育至 100 d 的嵌合体猴<sup>[18]</sup>。然而该文章未获得发育至 150 d 的存活嵌合体猴, 而且获得的嵌合体猴中注射入胚胎干细胞的嵌合比例只有 1%~18%, 说明利用胚胎干细胞囊胚注射获得基因修饰猴的方法还有很多技术问题需要解决。

## 2 单倍体干细胞

单倍体胚胎干细胞, 即只含有单套染色体, 却具有类似正常二倍体胚胎干细胞分裂分化能力的一类细胞。2011年, 剑桥大学的 Anton Wutz 实验室和奥地利科学院的 Josef M. Penninger 实验室分别独

立报道通过孤雌激活小鼠卵母细胞获得囊胚后建立的小鼠孤雌胚胎干细胞系，证明了在定期利用流式细胞分选的条件下，小鼠孤雌单倍体干细胞可以连续传代，并可以用来正向和反向遗传筛选<sup>[19-20]</sup>。2012年，来自国内的李劲松团队和周琪团队分别报道了通过将精子注入去核的卵母细胞构建胚胎获得囊胚后建立的小鼠孤雄胚胎干细胞系。令人兴奋的是，他们发现小鼠孤雄胚胎干细胞系的印记基因有类似精子的表达模式。进一步通过显微操作将体外进行基因修饰的孤雄胚胎干细胞注入小鼠卵母细胞构建的胚胎移植后能够获得携带转基因的存活的小鼠模型<sup>[21-22]</sup>，而且获得的动物模型也不存在嵌合现象，F0代即可用于科学研究。随后，李劲松团队通过将孤雌或孤雄单倍体胚胎干细胞 H19-DMR 和 IG-DMR 两个印记相关基因敲除提升了用单倍体胚胎干细胞构建小鼠的效率<sup>[23]</sup>。2013年，李劲松团队、孙强团队和金颖团队合作，首次获得了食蟹猴的孤雌单倍体胚胎干细胞系<sup>[24]</sup>。2016年，李劲松团队以及 Egli 团队分别报道获得了人的孤雌单倍体胚胎干细胞系<sup>[25]</sup>。虽然已经建立了食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞系，但是孤雄来源的单倍体胚胎干细胞系仍未成功报道。利用印记相关基因敲除孤雌单倍体的方法获得动物在非人灵长类也还没有成功，故应用单倍体胚胎干细胞系构建非人灵长类基因修饰动物模型仍有很长的路要走。

### 3 生殖干细胞

生殖干细胞介导的转基因主要包括两种方法，一种是通过睾丸输出管注射感染精原干细胞进行转基因动物模型制备，此方法已经成功应用于大小鼠模型构建工作上<sup>[26-27]</sup>。另外一种方法是从精巢组织中分离精原干细胞，并实现在体外长期培养和稳定传代，然后对体外培养的精原干细胞进行基因修饰，修饰后的精原干细胞注入受体动物精巢组织曲细精管中，增殖分化成球形精子或成熟精子，再利用筛选出的球形精子细胞注射卵母细胞，获得基因修饰动物，或直接让注射精原干细胞的动物与雌性动物交配获得基因修饰动物模型<sup>[28]</sup>。2003年，Takashi Shinohara 首先报道成功建立了可实现体外长期培养的小鼠精原干细胞培养体系和方法，并且发现长期培养的小鼠精原干细胞回移到精巢中仍具有分化成精子的能力，这也成为了判断精原干细胞分化潜能的金标准<sup>[29]</sup>。2015年，F. Kent Hamra 实验室利用大鼠的精原干细胞进行基因修饰并回移修饰后的精

原干细胞到精巢，然后利用回移大鼠跟母鼠自然交配获得了基因修饰的大鼠。但是文章中得到的大鼠精原干细胞只能短期传代，并没有实现长期传代，也就是说大鼠的精原干细胞培养条件还没有达到最优<sup>[30]</sup>。2016年，昆明动物所郑萍团队报道了可长期稳定传代的树鼩的精原干细胞，并将转染 GFP 的精原干细胞回移到树鼩精巢，通过交配获得了 5 只 GFP 阳性的转基因树鼩<sup>[31]</sup>。在非人灵长类方面，目前还没有报道分离获得可传代的精原干细胞，此领域的最新进展就是证明了从恒河猴精巢分离获得精原干细胞自体或异体回移后能够重新生成精子，但是由于无法将获得的精原干细胞体外传代培养，故无法高效地对精原干细胞进行基因修饰，这也限制了利用精原干细胞介导的转基因来构建非人灵长类动物模型的应用。如何在保持猴精原干细胞特性的前提下实现对精原干细胞的稳定体外传代培养是该领域的关键。

### 4 体细胞核移植

体细胞核移植，又称体细胞克隆，即将体细胞注入去核的卵母细胞中，使体细胞在卵母细胞中重编程并发育为新的胚胎，进而获得动物个体。体细胞核移植技术可用来构建基因修饰动物模型，通过体外对体细胞进行基因修饰，然后利用基因修饰的体细胞开展体细胞核移植实验，所获得的克隆动物即携带有特定的修饰基因。体细胞核移植的特点是技术要求高，效率低，所以此技术在最常见的小鼠动物模型构建中并不常用。但是对于胚胎干细胞和囊胚注射并未成功建立的物种，体细胞核移植可以作为一种可选择的基因修饰动物模型构建方法。利用此方法不仅可获得携带复杂修饰基因的动物模型，而且还具有基因型一致性高和不存在嵌合现象的优点，因此其 F0 代即可用于后续的研究，这对繁殖周期长的物种尤为重要。即使已经有了靶向核酸酶技术，但在基因修饰猪和牛等动物模型构建中体细胞核移植技术仍发挥着不可替代的作用<sup>[32-34]</sup>。由于猴胚胎干细胞囊胚注射并未获得成功，且靶向核酸酶在构建携带复杂基因修饰猴模型仍未成功，利用猴体细胞核移植来实现携带复杂基因修饰的猴模型一直是科学家们期望建立的技术方法之一。早在 1997 年，美国俄勒冈灵长类研究中心的科学家就利用恒河猴早期胚胎卵裂球细胞作为核供体获得了胚胎细胞克隆猴<sup>[35]</sup>。2006 年，同样是来自这一团队的科学家首先报道了恒河猴体细胞核移植来源



的胚胎干细胞系<sup>[36]</sup>。2011年,该团队报道获得了怀孕80天的体细胞核移植克隆猴,然而利用体细胞核移植获得存活的非人灵长类动物个体此前一直没有成功<sup>[37]</sup>。

2018年1月25日, *Cell* 期刊在线发表了题为“Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer”的研究论文,该研究成果由中国科学院神经科学研究所、脑科学与智能技术卓越创新中心非人灵长类苏州研究平台孙强团队完成<sup>[38]</sup>。在该研究中,作者通过优化猴体细胞核移植操作流程,利用组蛋白去甲基化酶和去乙酰化酶抑制剂提升体细胞克隆胚胎发育效率,进而将猴克隆胚胎移植到代孕受体中继续发育,成功获得了两只健康存活的食蟹猴“中中”和“华华”。此研究首次利用体细胞核移植技术获得了健康的克隆猴,为非人灵长类实验动物的基因编辑和模型构建提供了重要的技术支持。如果在体细胞核移植之前,通过基因编辑技术对体外培养的体细胞进行基因操作,然后通过筛选得到含有目的基因修饰的细胞,并筛查排除脱靶细胞。再利用核移植技术将筛选的阳性细胞作为体细胞供体得到克隆动物,即可得到没有嵌合及脱靶现象的动物模型,这样得到的首代动物不需要传代至下一代即可用来进行科学研究。而且此方法也可以通过体外筛选细胞来构建携带复杂基因修饰的动物模型。此外,由于体细胞可以在体外大量培养繁殖,利用相同遗传背景的同一体细胞进行核移植可以得到遗传背景完全一致的一群动物模型,这样就避免了利用胞浆注射得到的基因编辑动物遗传背景复杂的问题。

综上所述,基因编辑技术的出现给非人灵长类基因修饰动物模型的构建提供了快速发展的条件,以非人灵长类体细胞核移植为首的技术突破则进一步解决了常规受精卵胞质注射技术在非人灵长类模型构建方面的限制。可以预想到,以非人灵长类为动物模型的生命医学和基础研究的时代正在来临!

### [参 考 文 献]

- [1] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23: 720-3
- [2] Wang H, Yang H, Shivalila C, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910-8
- [3] Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 323-8
- [4] Liu Z, Zhou X, Zhu Y, et al. Generation of a monkey with MECP2 mutations by TALEN-based gene targeting. *Neurosci Bull*, 2014, 30: 381-6
- [5] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836-43
- [6] Wan H, Feng C, Teng F, et al. One-step generation of p53 gene biallelic mutant cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25: 258-61
- [7] Zuo E, Cai Y, Li K, et al. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Res*, 2017, 27: 933-45
- [8] Chen Y, Zheng Y, Kang Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 3764-74
- [9] Sato K, Oiwa R, Kumita W, et al. Generation of a nonhuman primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 127-38
- [10] Yao X, Liu Z, Wang X, et al. Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing. *Cell Res*, 2018, 28: 379-82
- [11] Cui Y, Niu Y, Zhou J, et al. Generation of a precise Oct4-hrGFP knockin cynomolgus monkey model via CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination. *Cell Res*, 2018, 28: 383-6
- [12] Smedley J, Bailey S, Perry R, et al. Methods for predicting sexual maturity in male cynomolgus macaques on the basis of age, body weight, and histologic evaluation of the testes. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2002, 41: 18-20
- [13] Ying Q, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453: 519-23
- [14] Tong C, Li P, Wu N, et al. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 467: 211-3
- [15] Hanna J, Cheng A, Saha K, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 9222-7
- [16] Gafni O, Weinberger L, Mansour A, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 2013, 504: 282-6
- [17] Fang R, Liu K, Zhao Y, et al. Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 488-96
- [18] Chen Y, Niu Y, Li Y, et al. Generation of cynomolgus monkey chimeric fetuses using embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 116-24
- [19] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131-4
- [20] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563-74
- [21] Yang H, Shi L, Wang B, et al. Generation of genetically

- modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149: 605-17
- [22] Li W, Shuai L, Wang H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407-11
- [23] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 221-32
- [24] Yang H, Liu Z, Ma Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23: 1187-200
- [25] Zhong C, Zhang M, Yin Q, et al. Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Res*, 2016, 26: 743-6
- [26] Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells *in vivo*. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1202-7
- [27] Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, et al. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14931-6
- [28] Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, et al. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 8018-23
- [29] McLean DJ, Friel PJ, Johnston DS, et al. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol Reprod*, 2003, 69: 2085-91
- [30] Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, et al. Targeted germline modifications in rats using CRISPR/Cas9 and spermatogonial stem cells. *Cell Rep*, 2015, 10: 1828-35
- [31] Li CH, Yan LZ, Ban WZ, et al. Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring. *Cell Res*, 2017, 27: 241-52
- [32] Lai S, Wei S, Zhao B, et al. Generation of knock-in pigs carrying Oct4-tdtomato reporter through CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *PLoS One*, 2016, 11: e0146562
- [33] Yang D, Yang H, Li W, et al. Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res*, 2011, 21: 979-82
- [34] Gao Y, Wu H, Wang Y, et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol*, 2017, 18: 13
- [35] Niu Y, Yu Y, Bernat A, et al. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 17663-7
- [36] Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2007, 450: 497-502
- [37] Sparman ML, Tachibana M, Mitalipov SM. Cloning of non-human primates: the road "less traveled by". *Int J Dev Biol*, 2010, 54: 1671-8
- [38] Liu Z, Cai Y, Wang Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2018, 172: 881-7. e7