

基因修饰中国猕猴技术的研究进展*

马云瀚^{1, 2, 3)} 杨世华^{2, 3)**}

(¹⁾ 昆明理工大学医学院, 昆明 650500; (²⁾ 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; (³⁾ 广东省兽医临床重大疾病综合防控实验室, 广州 510642)

摘要 实验动物是人类疾病研究的终身伴侣。由于在遗传进化、生理生化及病理方面与人类接近, 猕猴成为不可或缺的实验动物。基因修饰猕猴(或称基因工程猕猴)是从基因和基因调控角度在机体整体发育水平上认识人类生理和病理分子机制的重要实验材料和高等模型动物。目前, 高效的猕猴辅助生殖技术(assisted reproductive technologies, ARTs)和精确的基因编辑技术成为研制基因修饰猕猴的唯一途径。在中国猕猴(或恒河猴)的 ARTs 方面, 已经完成了精液采集与冷冻保存、超数排卵、体外受精和胚胎培养、胚胎移植和妊娠管理, 高效完成了“试管猴”。在基因编辑技术方面, 最近创建了 ZFN (zinc-finger nucleases)、TALEN (transcription activator-like effector nucleases)、CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9)载体, 为制作基因修饰猕猴创造了条件。我国已经成功研制了转基因和基因敲除的中国猕猴。随着基因编辑技术的突破和发展, 结合我国现有丰富的实验猕猴资源, 研究避免猕猴的生殖生理障碍, 我国有望成为国际化的、重要的基因修饰猕猴研发和生产基地。

关键词 中国猕猴, ARTs, 基因编辑技术, 基因工程动物

学科分类号 Q492, Q812

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00010

实验动物是人类疾病研究的终身伴侣, 围绕医疗生产和医学研究的需要, 根据自身生理与病理特征, 形成与物种特征和需求相关的发展方向。由于在进化、遗传、生理生化等方面与人类接近, 猕猴成为人类生理与病理研究的重要实验动物, 尤其在人类神经精神性疾病、代谢性疾病以及药物有效性验证等方面甚至具有不可取代的地位。随着细胞分子生物学技术的进步, 越来越多的研究需要从遗传的角度来探讨基因表达和调控在机体生命活动中的重要作用。因此, 创建基因修饰(或基因工程)灵长类动物对人类生命活动的认识和解决重大医学难题有重要价值。

自 20 世纪 80 年代, 利用建立的胚胎干细胞^[1]和辅助生殖技术(assisted reproductive technologies, ARTs)完成的基因敲除小鼠^[2]至今, 转基因、基因敲弱、基因敲除、基因敲入小鼠, 已经成功应用于功能基因组学、疾病分子病理研究以及药物靶向性验证和挖掘中, 这些基因工程小鼠产生了巨大的

科学价值、经济价值以及社会效益。当前, 随着基因编辑技术的创立和发展, 如 ZFN (zinc-finger nucleases)^[3]、TALEN (transcription activator-like effector nucleases)^[4]、CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9)^[5], 不仅仅利用胚胎干细胞来制作基因修饰的实验动物, 在胚胎细胞上创制基因修饰动物已经成为可能^[6]。对猕猴而言, 由于技术难度大、研究费用高、世代周期长, 且尚无形成嵌合体动物的干细胞系和体细胞核移植动物, 只有通过在胚胎细胞上直接进行基因

* 科技部重大科学研究计划重大科学问题导向项目(2012CBA01302), 新世纪国家优秀人才支持计划项目(NCET-12-1078), 国家自然科学基金资助项目(31071279)和广东省教育厅科技创新项目(2013KJCX0029)。

** 通讯联系人。

Tel: 020-85280234, E-mail: yshhm@163.com

收稿日期: 2014-01-09, 接受日期: 2014-06-17

编辑来获得基因修饰猕猴。据此,高效的 ARTs 和优秀的基因编辑技术就是基因修饰猕猴创制的基石。科学家在 2014 年初就预言,使用最新的 TALEN 和 CRISPR/Cas9 制备基因修饰猴将是新的一年值得期待的研究成果^[7]。中国猕猴(或者恒河猴)是世界上重要的实验灵长类动物,制作基因修饰中国猕猴具有重大意义。本文结合笔者研究工作,介绍基因修饰中国猕猴的研究进展。

1 中国猕猴辅助生殖技术

用于快速繁殖猕猴的 ARTs 主要包括精液的非损伤采集和冷冻保存、超数排卵及活体取卵、体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)或单精子胞浆注射(*intracellular single sperm injection*, ICSI)、胚胎培养、胚胎移植。由于猕猴资源相对稀少且研究周期长,要求所有技术必须具有高效性、非损伤性、可重复性和合理性。

1.1 猕猴精液的获取与冷冻保存

猕猴精液的非损伤采集方法主要是通过人工电刺激。在成年雄性猕猴麻醉后利用低压电极对阴茎或直肠实施脉冲电刺激,诱导其自助排出精液。本方法可重复性获取精液。

冷冻精液能克服由于时间、地域、材料来源等对猕猴胚胎及胎儿的快速扩繁的限制。在猕猴精液冷冻中, TTE(含有卵黄、糖类、抗生素等)是最常用的冷冻基础液,添加甘油或乙二醇等均可获得良好的冷冻保存效果^[8-9]。冷冻保存的容器和降温方法主要有 2 种,即在 4℃ 平衡后,装入 0.25 ml 麦管在液氮面上(约 5 cm 位置)平衡 10 min 后直接冷冻并保存在液氮中,或装入 2 ml 的中空玻璃管中用 MTG516 定向冰晶形成冷冻仪完成,冷冻过程中冰晶有序形成,之后在 -70℃ 平衡,最后将精液冻存在液氮中^[10]。这 2 种方法均可以完成猕猴精液的冷冻保存,只是定向冰晶形成冷冻法的设备昂贵,如果不考虑大容量保存精液,液氮面平衡法可满足猕猴精液冷冻保存的需求。另外,由于雌性猕猴存在着明显的阴道穹窿和子宫颈较弯曲,很难实施经子宫颈的人工授精(*artificial insemination*, AI)实验,而 IVF 就成为判定冻精受精能力的主要手段^[11]。

1.2 超数排卵是获得大量猕猴卵母细胞的唯一可行途径

成熟卵母细胞是胚胎生产、胚胎生物学及胚胎

干细胞研究、基因工程动物生产所必需的实验材料。由于离体卵巢材料有限和卵母细胞体外成熟技术尚未达到生产需要,所以利用外源生殖激素诱导体内卵巢多卵泡同步发育和成熟,通过腹腔镜或者超声仪介导下^[12]吸取卵巢卵泡液及成熟卵母细胞(*metaphase-II oocytes*, M II 卵),成为唯一获取猕猴卵母细胞的途径,这一过程称为超数排卵(简称超排),或称为卵巢刺激(*ovarian stimulation*)。

影响超排效果的因素很多,如卵供体动物的年龄、营养状况、品系、季节等因素。在中国猕猴超排方面,我国开展了大量研究工作^[13-14]。a. 首先考虑年龄因素,在幼畜已成为获取卵子的重要来源的理念上^[15],研究揭示,性成熟前猕猴(2~3 岁)超排后可获得成熟卵子,但卵子的数量和质量较成年动物低^[16]。一旦幼年猕猴发育至出现第一次月经,超排后便可获得同成年动物相似数量的成熟卵子,并且质量也达到成年动物的水平^[16-17]。随着成年猕猴年龄的增长,如达到 10 岁以上,获得成熟卵子的数量即随年龄增长而有逐渐下降的趋势^[18]。b. 体重也是重要的因素。体重轻(成年猕猴体重小于 4.0 kg)的猕猴可能存在早期发育不良及卵巢机能较差,超排的效果较差;而肥胖猕猴(体重大于 8.0 kg)可能存在内分泌失调,超排的效果也不好。c. 中国猕猴是季节性繁殖动物,在生殖季节初期(8、9 月份),可能由于个体差异的原因,部分猕猴在月经周期不规律的情况下超排,能够同步发育的卵泡数较少。因而,生殖季节初期平均取卵数相比其他生殖季节要偏低。d. 超排所用的生殖激素经历了较大的变革,最初使用生物提纯的促性腺激素,由于生物效价的稳定性差、来源差异大、易产生抗体等影响超排处理结果而停止使用^[9]。基因重组人促卵泡激素(*recombinant human follicle stimulating hormone*, rhFSH)应用于猕猴的辅助生殖中,表现出了很好的效果。国际上曾一度给猕猴注射 60~70IU rhFSH/d 诱导超生理数量卵巢卵泡发育,但是在实际使用中容易诱发卵巢发育巨大卵泡,甚至出现卵巢过度充血、出血,影响卵子的发育潜能^[17]。国外报道^[20]和我国大量的试验指出,单独应用 rhFSH 可以很好地诱导猕猴卵巢卵泡发育,不需要在超排早期用促性腺激素释放激素(*gonadotropin-releasing hormone*)拮抗剂抑制内源性促性腺激素来同步诱导卵泡发育成熟^[21],只要在 rhFSH 处理完成后一次性给予人绒毛膜促性腺激素(*human*

chorionic gonadotropin, hCG)就可以完成超排。进一步,我国研究报道了两种高效的超排方法:35IU rhFSH/d 和 17IU rhFSH(30%聚乙烯吡咯烷酮缓释)/d,这不仅降低了激素的用量,且提高了获得卵子的受精能力和胚胎发育的潜能^[17,22]。e.超排中hCG剂量和处理时间也很重要。实验证明,在22:00~24:00间注射剂量为1000~2000IU hCG(注射量与生产商有关),在其后的27~31h时,卵泡卵母细胞多处于M I期,32~36h期间卵母细胞多处于M II期;37h以上时,虽然卵子成熟率会进一步升高,但卵泡会发生自发排卵事件而损失卵子^[14]。f.统计还发现在月经1~4天均可以开始超排处理,这样有利于研究者调整实验的时间。为了提高猕猴的利用率,研究发现两个月经周期的时间间隔可有效完成中国猕猴的重复超排^[23]。

由于卵供体动物之间的生殖机能差别较大,即使考虑上述种种因素,但是仍有部分猕猴在激素刺激后仅获得少数几个成熟卵子(如5枚以下)。更糟糕的是这些对激素应答较差的动物往往在超排结束时才被发现,这不仅影响整个实验的安排和进度,也浪费人力和物力。为了寻找成功超排的预知因素,我们在超排过程中跟踪检测了动物体内甾类激素水平、卵巢大小与卵泡数量的变化,甚至包括动物的体温变化,结果发现月经期(月经的1~3天)卵巢卵泡的数量是预测卵供体动物对激素刺激应答的重要指标,这也揭示了卵供体动物应答的优劣可能与超排初期动物卵巢中已启动发育的生长卵泡(直径>0.5mm)数量有密切关系,这一发现从根本上降低了超排失败的可能性^[24]。

1.3 受精与胚胎形成

猕猴胚胎形成可通过4种途径来完成:

a.利用精卵结合方法,如AI和IVF。由于猕猴子宫颈腔狭小且弯曲,所以很难通过子宫颈完成AI,因而体内授精的研究进展缓慢^[25]。IVF就成为生产猕猴胚胎的主要途径。

b.利用显微操作技术构建胚胎,如ICSI技术^[26]、细胞核移植(nuclear transfer)技术^[26-27]、胚胎分割(embryos splitted)技术^[28-29]。ICSI是一种重要的生产胚胎的方法,可以避免由于卵母细胞透明带硬化、精子获能不足及数量限制等不利因素。

c.化学方法诱变M II卵形成胚胎,即孤雌激活(parthenogenetic)。依据卵质中存在促进卵裂的化学物质诱导M II卵自身染色体识别为合子基因组

的过程,将卵子诱变为单细胞胚胎^[30]。另外,用化学方法将小鼠的双细胞胚胎卵裂球融合,可发育成四倍体胚胎^[31],但是相关猕猴的研究尚未报道。

d.利用上述某一胚胎制作途径并结合基因修饰技术来生产具有特殊功能的胚胎,包括携带靶基因的胚胎(转基因胚胎)、嵌合体胚胎(干细胞嵌合)^[32]、基因敲除/敲入胚胎。对于猕猴,目前已有转基因胚胎^[20,33-34]和基因敲除胚胎的成功报道^[35-36]。

1.4 胚胎培养

人工控制的猕猴胚胎培养体系经历了三次变革,即体内培养技术、共培养体系、化学成分限定的培养体系。

体内培养技术,即寄生培养体系,在异种动物输卵管内培养。有研究曾将松鼠猴的早期胚胎培养在兔的输卵管^[37]。但是这种培养技术非常复杂,培养环境也很复杂,不适合于大量培养和胚胎发育生物学研究。

共培养体系在猕猴胚胎发育中也被利用。例如用体外培养的牛卵丘细胞、牛输卵管细胞、vero细胞、大鼠肝细胞等,对猕猴胚胎发育具有一定的促进作用^[38],但是复杂的胚胎培养微环境,对于胚胎生物学研究不利,且饲养细胞状态的不稳定性易造成培养体系的不确定性。

化学成分限定的培养基是研究胚胎发育生物学的最佳选择。在猕猴胚胎体外培养中,早期常用1066培养基^[39],近期常用HECM-9,囊胚发育率达到了47%^[40],但是仍然需要添加10%的胎牛血清。也有研究报道利用无血清的培养体系,但是胚胎发育率相对较低。

在HECM-9的培养体系中,猕猴胚胎的发育具有比较稳定的时序性,即在受精后20~24h、40~50h、70~76h、约120h、140h、160h,胚胎分别发育到2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚、扩张或正在孵化囊胚、孵化囊胚^[14]。由于不明原因而延迟发育的胚胎中,个别胚胎也可以发育到囊胚,但其质量有待进一步证实。

1.5 胚胎移植

胚胎移植由4方面内容组成:胚胎、受体动物、移植过程及早期诊断。胚胎移植的制约因素有胚胎质量、受体动物接受态与移植技术的可靠性以及各个技术相互精确集成。

1.5.1 胚胎质量是重要的因素

目前胚胎质量的鉴定体系不够完善,仍然依靠

对胚胎形态观察来判断胚胎发育和着床潜能。对于猕猴胚胎而言, 相对准确的发育时序、卵裂球均匀、无碎裂或很少, 且卵裂球色泽相对通透, 常被认为是正常的胚胎。

1.5.2 受体动物

胚胎移植的重点任务之一是如何选择受体动物, 并与胚胎发育的时期相吻合。根据动物月经周期情况不同, 受体动物有两种: 自然月经周期的受体动物(自然受体)和人工诱导超数排卵的受体动物(诱导受体)。

自然受体是猕猴胚胎移植的主要对象。除了青壮年、有经产史、营养状况良好等作为初步的选择条件外, 还必须考虑 2 个重要因素。a. 卵巢排卵和黄体形成。虽然血浆甾体激素水平变化, 如雌二醇(estradiol, E2)峰值出现后的迅速下降和孕酮(progesterone, P4)水平逐渐升高可预示排卵和黄体形成, 仍然需要腹腔镜或高频 B 超检测仪检查确认。b. 子宫内膜的发育状态。许多研究指出, 子宫内膜的厚度与胚胎着床有关。就人类而言, 子宫内膜大于 9 mm, 成功受孕率明显提高^[41]。但也有研究指出, 过厚的子宫内膜(大于 14 mm)可导致胚胎移植率和临床妊娠率降低, 早期流产率升高^[42]。对于自然受体动物, 其子宫的胚胎着床“窗口期”较长, 无论在排卵前, 还是排卵后的 3 天内, 都有接纳更早或同龄胚胎的潜能, 怀孕率可达到 33%, 或者更高^[11, 40, 43]。

我们在中国猕猴实验中, 超排失败的动物(即超排获得的成熟卵子少于 5 枚)接受胚胎移植后可以发生妊娠, 不需要额外的激素补给。但是, 超排良好的动物, 尚未获得成功妊娠(待发表)。其可能的原因有待深入分析。而在人类, 激素诱导排卵后可以实施胚胎移植, 但需要补充外源 hCG 和孕酮来维持子宫内膜的接受态和提供早期胚胎着床和发育的条件, 获得了胚胎及胎儿的正常发育^[44]。对食蟹猴的研究指出, 超排的动物可以作为同步胚胎移植的受体动物, 且胚胎可以着床和发育至分娩时期^[45]。

1.5.3 移植技术

胚胎移植技术也很关键。自 1984 年首次完成猕猴胚胎移植以来, 胚胎移植技术经历了较大的变革。腹部手术是最先被应用于猕猴胚胎移植的方法, 并沿用至今。但手术技术本身较繁琐, 对动物器官(输卵管、卵巢等)牵拉损伤大, 以及猕猴对手

术过程的应激较大, 特别是曾报道中国猕猴较印度猕猴对实施手术胚胎移植的成功率低, 分别为 22%和 26%^[11]。通过子宫壁穿洞方法也可以将胚胎移入子宫, 但胚胎可能被子宫创口涌出的血液包裹从而影响与子宫内膜接触, 未见成功报道。经阴道实施非手术宫腔内胚胎移植方法也是最先被尝试, 但由于猕猴子宫颈硬而狭长, 且宫颈口呈穹隆结构, 实际操作非常困难^[11, 40]。猕猴腹腔内窥镜技术是近年来被推崇的胚胎移植方法。尽管所需设备比较昂贵, 但移植的成功率较高, 特别是我们采用腹腔镜技术将胚胎移入受体动物的输卵管内, 于 2007 年首次研制了中国猕猴的“试管猴”^[17], 在转基因猕猴研究中, 胚胎移植成功率达到 50%以上^[41]。

1.5.4 妊娠早期诊断

胚胎移植后的妊娠早期诊断也很重要。因为猕猴妊娠期 160 天左右, 更早预知胚胎移植结果, 有利于把握实验进度。怀孕后阴道流血在猕猴中是一种普遍现象, 相应的机理尚不清楚, 所以是否出现阴道流血与成功妊娠并无明确的关系。用测试猕猴绒毛膜促性腺激素的水平来确定妊娠的诊断方法还不成熟, 通常办法是在猕猴怀孕早期(15~30 天)检测 3 次孕酮和雌激素水平, 均出现高水平就判断为阳性妊娠。在我们的研究中, 用高频 B 型超声检测仪可以检测到胚胎移植后 16 天的孕囊, 待怀孕至 30 天左右, 检测到跳动胎心即可确诊怀孕。

2 遗传修饰灵长类动物和载体

依据不同细胞类型, 如体细胞或干细胞、精子与卵母细胞、胚胎, 相适应的基因修饰载体和方法有所差异。几乎所有基因修饰载体均可在体细胞或干细胞上完成对基因组的改造, 但在灵长类动物上尚未报道利用基因修饰的体细胞或干细胞制作基因修饰动物。卵母细胞的遗传修饰目前几乎没有任何进展, 而对于精子而言, 通常的策略是在其形成与成熟过程中, 或者对精原干细胞进行基因修饰, 经体内外分化和成熟培养获得遗传改造的单倍体, 继而制作靶基因杂合子胚胎, 通过胚胎移植产生新型动物, 然而, 相关灵长类动物的研究尚未见报道。相比较, 胚胎就成为制作基因修饰猕猴的重要途径(图 1), 目前可在动物胚胎上实现基因修饰的载体种类较多, 如 DNA 片段、假病毒载体、基因敲入/基因敲除载体等, 部分载体已在猕猴胚胎上获得突破。

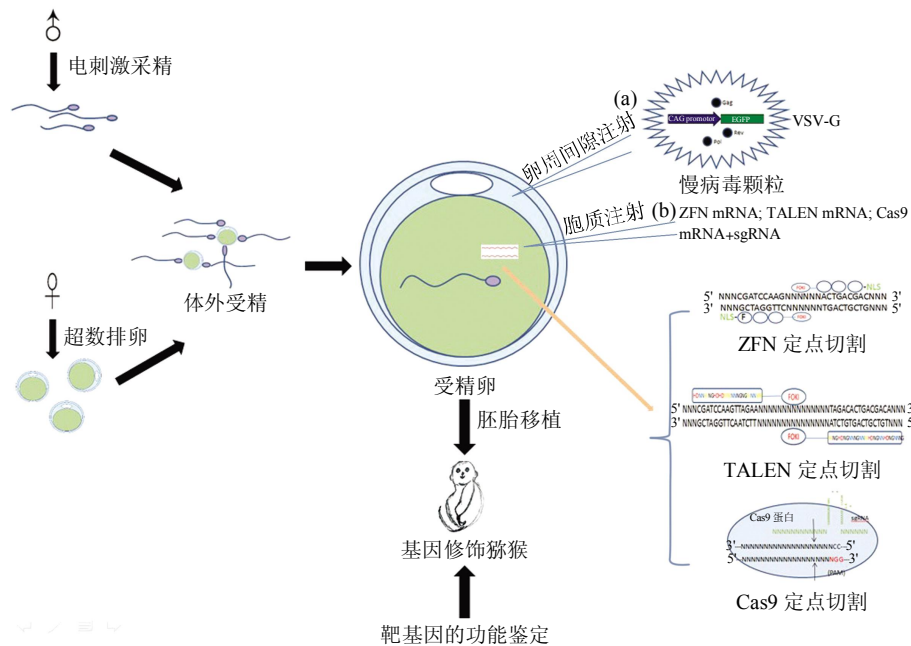


Fig. 1 Processing of genetically modified macaque

图 1 基因修饰猕猴的制备流程

(a)慢病毒载体制备转基因猕猴. (b)基因编辑技术制备基因修饰猕猴.

2.1 DNA 片段研制转基因动物

通过同源重组将外源基因整合到染色体的特定位点, 对基因功能的研究和遗传缺陷的修正提供有效的手段. 首例报道的是在小鼠受精卵中注射组织相容性 II 类基因, 对突变基因进行同源重组修复. 在出生的 1 800 多只小鼠中, 有 500 只是转基因的, 但只有一只是通过同源重组整合到相应染色体位点^[46]. 此外, 在转基因反刍动物的制备中, 也有报道采用 1- 细胞胚胎注射 DNA 片段生产转基因牛^[47]、山羊^[48]和绵羊^[49], 但是效率均很低. 由此, 利用 DNA 片段的同源重组原理制备基因修饰猕猴存在巨大挑战.

2.2 假病毒载体研制转基因动物

早期的转基因猕猴研究中, 采用了 VSV-G (vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G) 逆转录病毒载体, 携带 hEF-1 α 启动子 (human elongation factor-1 alpha promoter) 控制标记基因绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达, 该载体注射到 M II 卵的卵周间隙, 在 2001 年获得国际上第一只转基因猕猴 ANDi^[33]. 最近, 在我国利用含有 CAG 启动子 (cytomegalovirus enhanced chicken β -actin promoter) 和增强型绿色荧光蛋白

(enhanced green fluorescent protein, EGFP) 标记基因的 SIV (simian immunodeficiency virus) 慢病毒载体, 通过卵周间隙感染猕猴早期胚胎, 约 50% 胎儿为 EGFP 阳性, 其中顺利产生 2 只表达 EGFP 转基因猕猴^[34]. 日本科学家以 HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) 载体, EGFP 为标记基因, 用分别含有 CAG、CMV (cytomegalovirus promoter) 和 EF1- α 不同启动子的慢病毒载体, 感染猕猴早期胚胎. 经胚胎移植出生的 5 只小猴中, 有 3 只由 CAG 启动子介导, 2 只由 CMV 启动子介导, CMV 启动子介导产生的转基因猕猴相对于 CAG 启动子来说外源基因整合到基因组位点的概率相对较高. 转基因猕猴性成熟后, CMV 和 CAG 介导的转基因猴均能通过生殖细胞传递靶基因到子代动物^[50].

利用慢病毒载体携带人 *HTT* (human huntingtin gene) 第 1 个外显子和 84 个谷氨酰胺 (cytosineadenine-guanine, CAG, translated into glutamine) 重复基因研制的亨廷顿疾病 (huntington's disease, HD) 转基因猕猴模型是国际上第一例的基因修饰猕猴疾病模型. 通过将载体注射到 M II 卵的卵周间隙中, 进行 ICSI 获得胚胎, 并培养至

4~8 细胞时期移植, 获得 5 只转 *HTT* 基因雌性猕猴. 这种 *HTT* 变异基因在 2 只猕猴的组织中高度表达, 含有大量 CAG 三联密码重复单元数量, 动物表现为呼吸困难和其他运动神经损伤行为, 肌张力障碍和舞蹈病的重要临床特点, 大脑病理组织中也观察到包括核内包涵体和神经纤维网聚合物的亨廷顿氏舞蹈病典型特征, 且临床症状与变异基因表达量有相关性^[20].

2.3 新型基因敲除载体研制基因修饰动物

在过去的 10 多年中, 科学家一直致力于寻找可针对不同的细胞类型及物种的精确基因操纵技术, 这种技术被称为“基因编辑(gene editing)”^[51]. 其由序列特异性的 DNA 识别元件和非特异性的 DNA 切割核酸酶元件构成的嵌合工程核酸酶来完成. 最早于 2007 年, 利用锌指蛋白与 DNA 序列特异结合作用, 设计包含了 DNA 序列特异识别蛋白和 Fox I 内切酶的 ZFN 载体, 实施定向靶 DNA 切割, 造成 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB). DSB 能够激活细胞内固有的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源定向修复(homology-directed repair, HDR)机制, 来完成 DNA 损伤修复^[52]. 其中 NHEJ 是一种较为简单的修复方式, 在不存在切口处同源序列指导的情况下, 断裂的 DNA 双链自发重新连接起来, 很容易造成 DNA 断裂处的序列发生改变, 产生 DNA 的小片段插入或缺失. 在存在同源序列的情况下, 可以通过 HDR 的方式直接修复, 其效率相对较低. 如果提供外源 DNA, 则可以通过高保真的 HDR 在靶点插入外源基因, 从而产生新的基因修饰物种, 如研制的大鼠、斑马鱼、猪等. 2009 年, 借助 TALE(transcription activator-like effector)蛋白识别单个 DNA 碱基的特性和 Fox I 内切酶的定点切割机制, 构建了第 2 类基因敲除载体 TALEN^[53].

TALEN 可根据靶基因序列设计和合成特异的 DNA 识别与结合结构域, 可更精确地实现定点基因修饰功能, 不仅成功应用于斑马鱼^[54], 果蝇^[55], 小鼠^[56] 等模式生物, 而且在大型动物中也完成基因修饰^[57].

2012 年, 第 3 类基因编辑技术 CRISPR/Cas9 问世^[58], 利用单导向 RNA(single guide RNA, sgRNA) 的识别功能和 Cas9 蛋白的切割功能构建打靶载体^[59], 高效完成 DNA 靶点切割. 随后, 对 CRISPR/Cas9 的进一步优化, 可以针对大鼠的 1 个基因家族的单个或多个基因进行同步敲除^[60], 与此同时也报道对小鼠的基因组多个位点同步敲除获得

成功, 使得基因编辑技术更加有效^[61].

2014 年 3 月, 我国科学家首次使用 TALEN 基因编辑技术完成了对恒河猴和猕猴基因组的修饰^[59]. 位于 X-染色体的 *MECP2* 广泛表达甲基-CpG 结合蛋白 2, *MECP2* 功能性缺失将会导致神经发育障碍, 是众所周知的 Rett 综合症(RTT). 根据 *MECP2* 基因的第三外显子设计 3 对 TALEN 打靶载体, 向猕猴的 1-细胞胚胎胞质注射 TALEN 环状质粒 DNA, 8-细胞胚胎突变率达 40%~50%. 流产的 3 只雄猴胚胎的各种组织以及睾丸组织中检测到大量的 *MECP2* 突变. *MECP2* 基因突变可能引起对雄性胚胎死亡和流产, 其高发率与人类相似. 通过 TALEN 载体处理, 获得新生雌猴 1 只, 通过对其胎盘、脐带以及表皮活组织检测, 发现大量的 *MECP2* 突变, 可能由于年龄的原因尚未报道 RTT 症状. 同时, 也证明了潜在脱靶位点未见基因修饰和 TALEN 质粒 DNA 整合发生.

2014 年 2 月 13 日 *Cell* 刊物报道了我国科学家利用 CRISPR/Cas9 载体在猕猴 1-细胞胚胎上首次实现了猕猴基因的精确敲除^[60]. 研究中针对 3 个基因 *Nr0b1*、*Ppar-γ* 和 *Rag1* 设计 5 种 sgRNAs, 与 Cas9 mRNA 共同注射到 1-细胞胚胎中, 经胚胎移植成功分娩了一对双胞胎, 在它们的脐带、胎盘、耳组织中都检测到基因 *Ppar-γ* 和 *Rag1* 的突变, 证明 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以有效地实现猕猴多基因修饰. 但是没有检测到 *Nr0b1* 基因突变, 可能是由于该基因有较低的突变率. 基因修饰操作的胚胎及胎儿的基因测序结果证实了靶基因的多基因型, 说明 CRISPR/Cas9 体系在操作基因修饰时可能发生在胚胎的不同发育时期, 最终导致了嵌合体的产生. 在该研究中, 通过对脐带组织 DNA 中 84 个潜在的脱靶位点进行全面检测, 未发现任何突变. 这说明 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在修饰猕猴基因组的过程中, 可能不存在脱靶效应, 为以后高效制备基因工程猕猴提供高效的技术支撑.

3 展 望

在我国, 2007 年报道了首例中国猕猴“试管猴”^[7], 随后于 2008 年报道了食蟹猴“试管猴”^[62], 此项研究较国外晚了近 20 年; 于 2010 年报道了转 GFP 基因中国猕猴, 较国外晚了 10 年, 但是胚胎移植的效率远远超过国际报道的 33%的比率^[54]. 至此, 我国成为继美国和日本之后第 3 个拥有研制转基因灵长类动物技术体系的国家. 于 2014 年相继

报道首次使用新型载体成功制备基因敲除灵长类动物^[35-36], 奠定了我国在制备基因修饰猕猴的技术方面的引领国际发展地位. 目前, 我国以出口为主的猕猴养殖业受到国际航空运输等问题的限制^[63], 当前国内实验猕猴资源供应充足且品质优良; 基于国际上基因编辑技术的创建和成熟, 这些为基因工程猕猴创制创造了条件. 因此, 我国有望成为基因工程猕猴研发和创制的重要国际化研发和生产基地, 填补基因工程小鼠对于生命科学及医学研究中存在的不足.

由于中国猕猴自身生殖生理特征的限制, 制作基因工程猕猴还有许多需要解决的科学与技术问题. a. 非人灵长类干细胞的全能性尚未得到验证, 研制嵌合体动物无法实现, 尤其条件性基因敲除猕猴尚无任何头绪. b. 利用体细胞核移植技术尚未成功制作克隆猕猴, 限制了由体细胞创制基因工程猕猴的途径. c. ARTs 中, 仍然有许多技术尚未成功, 如利用精原干细胞分化的精子制作胚胎, 卵母细胞和胚胎的冷冻研究还很有限, 超排动物能否同步作为受体, 胚胎受体动物筛选标准仍然不详等; 对卵母细胞和胚胎质量的精确、便捷、无损性的检测技术还不成熟, 无损伤胚胎移植技术的优化尚未开展; 胎儿发育及器官发育的基础数据尚属空白. d. 猕猴世代周期很长, 首次怀孕或繁殖的年龄一般为 4~5 岁, 以及恒河猴仅有半年的生殖季节, 这些因素极大限制了猕猴生殖工程研究的进度. e. 虽然载体(转基因, 基因敲除、基因敲入载体)的研发已经获得了较大突破和创新, 但是由于猕猴资源的特殊性, 对于载体效率提出了非常高的要求, 所以基因工程猕猴产业化体系仍然需要不断优化. 另外, 针对同一基因的 TALEN 或 CRISPR/Cas9 载体制作基因敲除动物存在基因修饰上差异, 能否短时间内大量研制纯合子动物仍然是谜团. f. 研究成本高.

参 考 文 献

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819): 154-156
- [2] Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, **51**(3): 503-512
- [3] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, *et al.* Knockout rats *via* embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, **325**(5939): 433
- [4] Breakthrough of the year. The runners-up. *Science*, 2012, **338**(6114): 1525-1532
- [5] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(3): 208-209
- [6] Yang H, Wang H, Shivalila C S, *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, **154**(6): 1370-1379
- [7] What to expect in 2014. Nature takes a look at what is in store for science in the new year. *Nature*, 2014, **505**(7481): 13
- [8] Si W, Zheng P, Li Y, *et al.* Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) sperm. *Am J Primatol*, 2004, **62**(4): 301-306
- [9] Yang S, Ping S, Si W, *et al.* Optimization of ethylene glycol concentrations, freezing rates and holding times in liquid nitrogen vapor for cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. *J Vet Med Sci*, 2011, **73**(6): 717-723
- [10] Si W, Lu Y, He X, *et al.* Directional freezing as an alternative method for cryopreserving rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. *Theriogenology*, 2010, **74**(8): 1431-1438
- [11] Wolf D P. Assisted reproductive technologies in rhesus macaques. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, **2**(1): 1-11
- [12] Larson J E, Morrow S L, Delcarpio J B, *et al.* Gene transfer into the fetal primate: evidence for the secretion of transgene product. *Mol Ther*, 2000, **2**(6): 631-639
- [13] 杨世华. 猕猴辅助生殖原理与技术. 昆明: 云南科技出版社, 2009: 73-94
Yang S H. Principles and Technologies of Assisted Reproduction in Rhesus Macaques. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2009: 73-94
- [14] 季维智, 杨世华, 司维. 猕猴繁殖生物学. 北京: 科学出版社, 2013: 101-125
Ji W Z, Yang S H, Si W. Reproduction and Breeding of Rhesus Monkey. Beijing: Science Press, 2013: 101-125
- [15] Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, *et al.* Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *FASEB J*, 2004, **18**(2): 335-337
- [16] Yang S, He X, Niu Y, *et al.* Ovarian response to gonadotropin stimulation in juvenile rhesus monkeys. *Theriogenology*, 2009, **72**(2): 243-250
- [17] Yang S, He X, Hildebrandt T B, *et al.* Effects of rhFSH dose on ovarian follicular response, oocyte recovery and embryo development in rhesus monkeys. *Theriogenology*, 2007, **67**(6): 1194-1201
- [18] Schramm R D, Paprocki A M, Bavister B D. Features associated with reproductive ageing in female rhesus monkeys. *Hum Reprod*, 2002, **17**(6): 1597-1603
- [19] Bavister B D, Dees C, Schultz R D. Refractoriness of rhesus monkeys to repeated ovarian stimulation by exogenous gonadotropins is caused by nonprecipitating antibodies. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1986, **11**(1): 11-16

- [20] Yang S H, Cheng P H, Banta H, *et al.* Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 2008, **453**(7197): 921-924
- [21] Zelinski-Wooten M B, Hutchison J S, Hess D L, *et al.* Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Hum Reprod*, 1995, **10**(7): 1658-1666
- [22] Yang S, He X, Hildebrandt T B, *et al.* Superovulatory response to a low dose single-daily treatment of rhFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone in rhesus monkeys. *Am J Primatol*, 2007, **69**(11): 1278-1284
- [23] Yang S, Shen Y, Niu Y, *et al.* Effects of rhFSH regimen and time interval on ovarian responses to repeated stimulation cycles in rhesus monkeys during a physiologic breeding season. *Theriogenology*, 2008, **70**(1): 108-114
- [24] Yang S, He X, Niu Y, *et al.* Dynamic changes in ovarian follicles measured by ultrasonography during gonadotropin stimulation in rhesus monkeys. *Theriogenology*, 2009, **72**(4): 560-565
- [25] Gabriel Sanchez-Partida L, Maginnis G, Dominko T, *et al.* Live rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm. *Biol Reprod*, 2000, **63**(4): 1092-1097
- [26] Byrne J A, Pedersen D A, Clepper L L, *et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2007, **450**(7169): 497-502
- [27] Zhou Q, Yang S H, Ding C H, *et al.* A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey. *Hum Reprod*, 2006, **21**(10): 2564-2571
- [28] Chan A W, Dominko T, Luetjens C M, *et al.* Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science*, 2000, **287**(5451): 317-319
- [29] Mitalipov S M, Wolf D P. Nuclear transfer in nonhuman primates// Verma P J, Trounson A. *Methods in Molecular Biology*, **348**. Totowa: Humana Press, 2006: 151-168
- [30] Mitalipov S M, Nusser K D, Wolf D P. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol Reprod*, 2001, **65**(1): 253-259
- [31] Eglitis M A. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *J Exp Zool*, 1980, **213**(2): 309-313
- [32] Liu H, Zhu F, Yong J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(6): 587-590
- [33] Chan A W, Chong K Y, Martinovich C, *et al.* Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 2001, **291**(5502): 309-312
- [34] 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**(41): 17663-17667
- [35] Liu H, Chen Y, Niu Y, *et al.* TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, **14**(3): 323-328
- [36] 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**(4): 836-843
- [37] Boland M P. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 1984, **21**(1): 126-137
- [38] Zhang L, Weston A M, Denniston R S, *et al.* Developmental potential of rhesus monkey embryos produced by *in vitro* fertilization. *Biol Reprod*, 1994, **51**(3): 433-440
- [39] Morgan P M, Boatman D E, Bavister B D. Relationships between follicular fluid steroid hormone concentrations, oocyte maturity, *in vitro* fertilization and embryonic development in the rhesus monkey. *Mol Reprod Dev*, 1990, **27**(2): 145-151
- [40] Wolf D P, Thormahlen S, Ramsey C, *et al.* Use of assisted reproductive technologies in the propagation of rhesus macaque offspring. *Biol Reprod*, 2004, **71**(2): 486-493
- [41] El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, *et al.* The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*, 2008, **89**(4): 832-839
- [42] Weissman A, Gotlieb L, Casper R F. The detrimental effect of increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and outcome in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril*, 1999, **71**(1): 147-149
- [43] Chen Y, Niu Y, Yang S, *et al.* The available time window for embryo transfer in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol*, 2012, **74**(2): 165-173
- [44] Araujo E, Jr., Bernardini L, Frederick J L, *et al.* Prospective randomized comparison of human chorionic gonadotropin versus intramuscular progesterone for luteal-phase support in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*, 1994, **11**(2): 74-78
- [45] Ng S C, Chen N, Yip W Y, *et al.* The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. *Development*, 2004, **131**(10): 2475-2484
- [46] Brinster R L, Braun R E, Lo D, *et al.* Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(18): 7087-7091
- [47] Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, *et al.* Generation of transgenic dairy cattle using '*in vitro*' embryo production. *Biotechnology (N Y)*, 1991, **9**(9): 844-847
- [48] Ebert K M, Selgrath J P, DiTullio P, *et al.* Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (N Y)*, 1991, **9**(9): 835-838
- [49] Niemann H, Halter R, Carnwath J W, *et al.* Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res*, 1999, **8**(3): 237-247
- [50] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, *et al.* Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 2009, **459**(7246): 523-527
- [51] Gaj T, Gersbach C A, Barbas C F III. ZFN, TALEN, and CRISPR/

- Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, **31**(7): 397-405
- [52] Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 2006, **40**: 363-383
- [53] Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, **326** (5959): 1501-1501
- [54] Bedell V M, Wang Y, Campbell J M, *et al.* *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, **491**(7422): 114-118
- [55] Liu J, Li C, Yu Z, *et al.* Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, **39**(5): 209-215
- [56] Sung Y H, Baek I J, Kim D H, *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*, 2013, **31** (1): 23-24
- [57] Carlson D F, Tan W, Lillico S G, *et al.* Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(43): 17382-17387
- [58] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(8): 691-702
Fang R, Chang F, Sun Z L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(8): 691-702
- [59] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816-821
- [60] Li W, Teng F, Li T, *et al.* Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(8): 684-686
- [61] Wang H, Yang H, Shivalila C S, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, **153**(4): 910-918
- [62] Sun Q, Dong J, Yang W, *et al.* Efficient reproduction of cynomolgus monkey using pronuclear embryo transfer technique. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(35): 12956-12960
- [63] Shen H. Precision gene editing paves way for transgenic monkeys. *Nature*, 2013, **503**(7474): 14-15

Advances in Genetically Modified Chinese Macaques*

MA Yun-Han^{1,2,3)}, YANG Shi-Hua^{2,3)**}

¹⁾ Faculty of Medical, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

²⁾ College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

³⁾ Key Laboratory of Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract Experimental animals and human disease research are a symbiotic relationship in life science field. Due to the proximity with humans in the aspects of genetic evolution, physiology, biochemistry and pathology, macaque monkeys become indispensable experimental animals in biomedicine research. Genetically modified macaques (also known as genetic engineering macaques) could be important experimental materials and advanced animal models for understanding molecular mechanisms of human physiology and pathology under observation of expression and being regulation of the targeted gene modified in the whole life of animals. Currently, combination of high-efficient assisted reproductive technologies (ARTs) in macaques with precise gene editing technologies is the only way of developing genetically modified monkeys. Now in China, ARTs in Chinese rhesus macaques included semen collection and cryopreservation, superovulation, *in vitro* fertilization and embryo culture, embryo transfer and pregnancy management, thus "test-tube monkey", and all have been efficiently completed. The establishment and development of the current gene editing technology, ZFN (zinc-finger nucleases), TALEN (transcription activator-like effector nucleases) and CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9), create great chances for production of genetically modified macaques. Scientists in China have successfully developed transgenic macaques with overexpression of green fluorescence protein gene and gene mutagenesis in macaques. With the breakthrough and development of various technologies, combined with abundant experimental macaque resources, avoiding various reproductive physiological obstructions of macaques, China is expected to become an appropriate international base in application of genetic engineering macaques.

Key words Chinese macaque, ARTs, gene editing technology, genetic engineering animals

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00010

* This work was supported by grants from The Major Scientific Problem-oriented Project of Major Scientific Research Projects in The Ministry of Science (2012CBA01302), Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-12-1078), The National Natural Science Foundation of China (31071279), Science and Technology Innovation Project in Department of Education of Guangdong Province (2013KJCX0029).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85280234, E-mail: yshhm@163.com

Received: January 9, 2014 Accepted: June 17, 2014