

## 热点评析

## 体内原位基因组编辑——介绍一种新的基因治疗技术

黄芳 郭礼和

(复旦大学上海医学院, 上海 200032)

近几年, 随着人工设计和合成的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)及转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)等技术的建立和发展, 对高等动物包括人类在内的基因组DNA可以进行体内原位改造或修饰。这项技术也称在体基因组编辑(*in vivo genome editing*)。今年7月14日*Nature*杂志发表的一篇研究论文, 报道了在血友病小鼠模型上利用ZFN技术对模型小鼠肝脏细胞基因组进行在体编辑, 重建了疾病小鼠的凝血功能<sup>[1]</sup>, 这一工作可谓是这个领域最新发展的一个代表。本文将介绍这一工作, 并对ZFNs和TALENs作一简短的描述。

## 1 锌指核酸酶与转录激活因子样效应物核酸酶

对患者基因组实施体内原位定向改造主要依赖于ZFNs和TALENs这两种人工核酸酶构建技术的发明。两种技术在原理和方法学上很相似, 都是利用人工设计和构建的基因, 编码含有两种功能结构域(分别识别DNA特异序列和限制性内切酶*Fok I*催化序列)所形成的复合蛋白酶, 利用基因工程表达技术而获得此种人工核酸酶。将该酶导入靶细胞, 可以造成基因组特异性位点的断裂。根据需要, 在此断裂位点可引发同源重组或非同源重组, 从而导致基因组特定位点的删除、片段插入或取代等基因改造或修饰。

*Fok I*是来自海床黄杆菌的一种DNA内切酶, 其催化活性必须要在DNA序列上形成相互靠近的二聚体后才能发挥内切酶作用, 因此, 构建的人工核糖核酸酶大多是由一对分别识别靶位两侧DNA序列的蛋白组成。

ZFN的DNA序列识别结构域利用了生物体中广泛存在的锌指蛋白结构, 一般一个锌指结构域识别3~4个碱基序列, 为保证序列的特异性, 每个ZFN

蛋白常包含了3个锌指结构域, 一对ZFN蛋白就可以识别24个碱基对的DNA序列, 保证了它的序列专一性。TALEN的DNA序列识别结构域来自一种植物病原菌——黄单胞菌的TALE蛋白, 这类蛋白由病菌分泌进入植物细胞, 结合并激活宿主细胞特异基因, 为细菌入侵植物所需要。TALE蛋白的DNA结合域由一串连续排列、序列高度同源的蛋白结构域模块构成, 每个模块大小为34个氨基酸, 模块的第12位和13位的氨基酸的变化, 可以使得该模块蛋白分别专一性识别1个特定的碱基对, 因此, 根据靶序列的特征, 组装这些模块就可以形成结合不同DNA序列的结构域。目前, 报道的TALEN的构建方法大多含有12个模块, 因此一对TALEN蛋白可以识别24个碱基对的靶点。

上述两种技术目前都能够根据靶序列进行设计, 再由基因合成完成核酸酶的构建。和TALEN的方法相比, ZFNs的分子量较小, 有一定的优势, 但ZFNs的构建常常需要经过筛选, 尽管最近也报道了可以通过设计获得<sup>[2]</sup>, 但相比而言, TALEN的方法似乎更具设计性<sup>[3]</sup>。

目前, 两种方法已在包括果蝇、斑马鱼、小鼠、人类等多种细胞内成功进行了基因的定点突变、置换、删除等遗传工程操作, 尽管两种技术在专一性、效率等方面都还有待进一步提高。这种操作对物种的副作用和毒性尚需进一步观察, 但就目前水平而言, 在物种改造、基因治疗等方面已呈现出巨大的应用前景。

## 2 利用锌指核酸酶技术在血友病小鼠模型上重建凝血功能

发表在今年7月14日*Nature*杂志上的这一研究工作是由费城儿童医院和宾夕法尼亚大学的研究人员共同完成的。

病毒载体介导的基因替代治疗或基因治疗已

在多种动物模型及病人上获得成功。然而, 基因替代疗法的不足之处在于存在如下风险: 外源基因插入往往是随机的, 容易引起突变; 插入的外源基因往往不受相应的内源基因的调节和控制, 缺少控制基因表达的内源性调节信号, 在生理上与内源性代谢不协调。

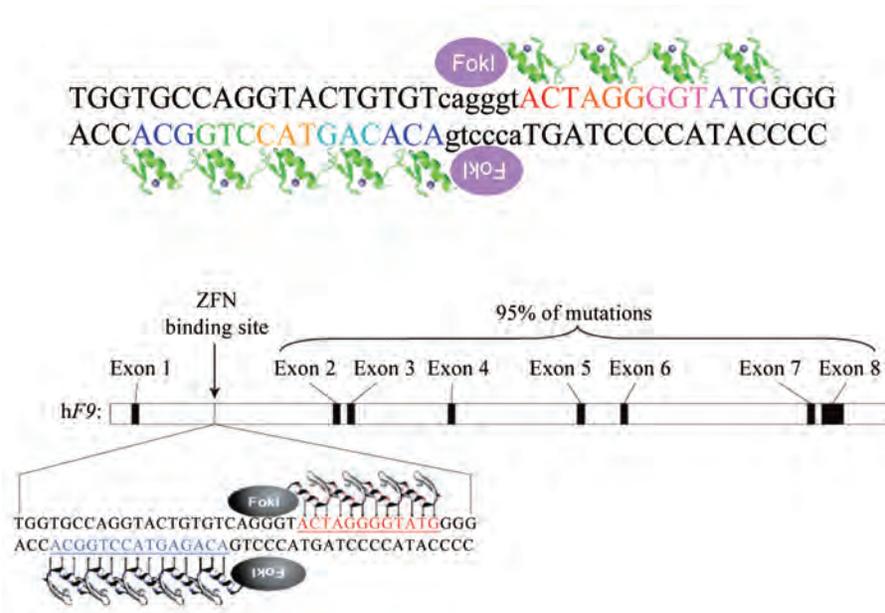
iPS结合基因打靶技术可以矫正致病性突变, 有可能减少上述基因替代治疗的风险, 但对于大多数遗传性疾病而言, 体外改造特定细胞并回输给患者的方法并不可行, 因为iPS本身是由外源基因插入诱导而来的, 容易致癌, 安全性至今仍未解决。过多细胞的回输不仅生产成本难以承受, 而且安全得不到保障。

血友病B是一种血液凝结出现问题的遗传病, 病因是肝脏中F9基因编码的凝血IX因子缺乏(由该基因突变而引起的), 出血时血液很难凝固, 造成严重失血, 甚至死亡。其基因位于x染色体的长臂27.1位点, 长度约35 Kb, 由8个外显子组成。该基因发生突变会造成凝血IX因子结构异常或缺失, 从而导致程度不同的凝血功能障碍。近年来, 血友病B成为探讨遗传病发病机理、基因诊断、基因治疗的主要研究对象。为了不同研究目标, 一般需要建立不同的

病理动物模型, 以便深入而精确地研究。

正常人体内, 血液循环的正常IX因子浓度可达5 000 ng/mL, 而患者体内IX因子的浓度不足正常人的1%。若能将血液里的浓度恢复至5%左右(即250 ng/mL), 就能够大大减轻疾病的严重程度。已有研究表明, F9基因95%的突变散布在外显子2~8内。为了验证锌指核酸酶介导的基因矫正策略是否可行, 研究人员首先构建了人源化血友病B转基因小鼠模型。转基因载体中用的人F9微基因(mini-gene)命名为hF9mut, 它的表达受肝脏特异性增强子和启动子调控。该基因在第6外显子内存在Y155终止突变, 不能表达完整的人凝血IX因子, 故而没有凝血功能。通过基因敲入技术可定点插到小鼠的ROSA26位点, 转基因小鼠体内该基因可以表达, 但因产物没有功能, 故而检测不到人IX因子的凝血活性。该转基因小鼠进一步同内源F9基因敲除的小鼠交配, 可获得人源化血友病B模型小鼠(hF9mut/HB), 该小鼠既缺乏鼠源又缺乏人源凝血IX因子。

采用人工设计和合成的锌指核酸酶(图1的上半部)介导的打靶策略(图2), 在上述微基因内含子1中插入剪接受体位点(splice acceptor site, SA)(图1的下半部)和正常人F9基因外显子2~8的DNA片段, 通过



图的上半部分显示人工设计的hF9锌指核酸酶(hF9 ZFNs), 特异性识别人凝血IX因子基因的内含子1片段内的27个核苷酸序列(用不同颜色标记, 同一颜色标的碱基为同一密码子), 中间用小写英文字母的6个碱基对为Fok I酶识别序列; 图的下半部分显示hF9锌指核酸酶结合hF9基因内含子1的部位。(根据参考文献[1]修改)

图1 锌指核酸酶的DNA特异序列和酶切位点识别及其介导的人凝血IX因子基因(hF9)打靶示意图

与外显子1的拼接,表达出具有功能活性的人IX因子(图3)。研究人员利用人源化血友病B病理模型小鼠研究了锌指核酸酶介导的在体(*in vivo*)的基因打靶和原位(*in situ*)的突变F9基因的矫正。

为将F9锌指酶(F9 ZFNs)导入肝脏,作者采用了具有亲肝性的腺相关病毒AAV8作为载体,AAV8-ZFNs上F9 ZFNs的表达受肝脏特异性增强子和启动子控制。出生第二天的hF9mut/HB小鼠腹腔注射AAV8-ZFNs及矫正载体AAV8-donor,10周后,制备肝脏DNA,检测了hF9位点处通过同源重组修复(homology-directed repair, HDR)方式产生的基因替代。经PCR鉴定,同源重组效率在1%~3%。因此,利

用AAV载体,同时导入ZFNs和同源重组模板可以在体内产生同源重组。

对接受AAV8-ZFN和AAV8-donor的hF9mut/HB小鼠,进行血浆检测,人的IX因子浓度为166~354 ng/mL,达到血液正常值的3%~7%。即使进行部分肝切除手术(partial hepatectomies, PHx),再生的肝脏组织仍然维持血浆中人IX因子的原有水平。采用活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, aPTT)分析法,测定血块形成动力学参数,野生型小鼠和血友病B小鼠的aPTTs分别为36秒和67秒,而接受AAV8-ZFN和AAV8-donor而进行体内原位基因组编辑的小鼠,其aPTT缩短为44秒,与野生型小鼠相

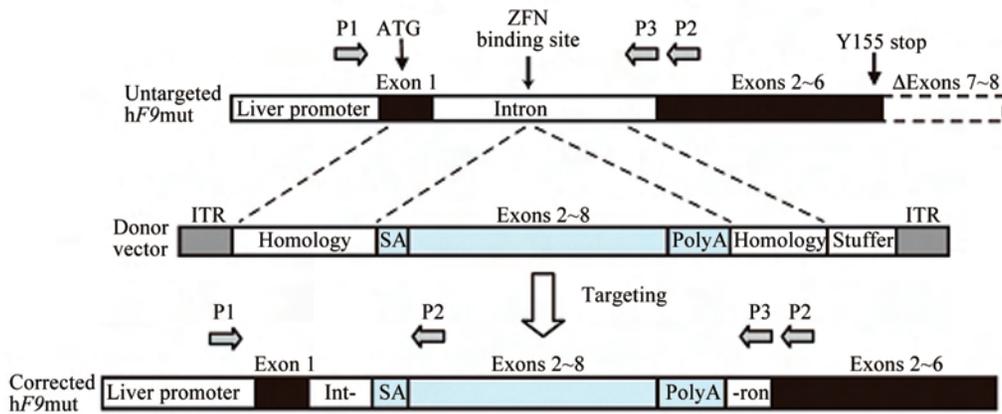


图2 人F9微基因打靶策略<sup>[1]</sup>

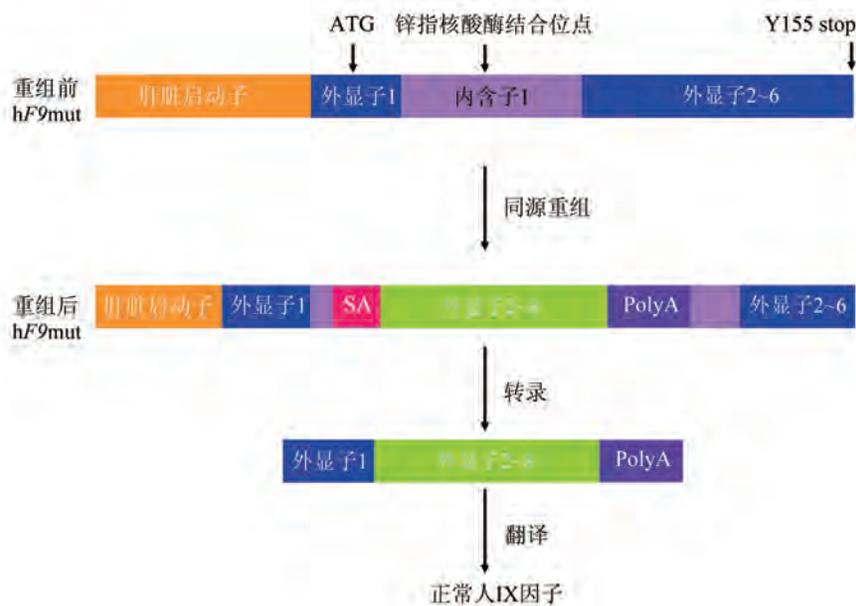


图3 通过体内原位基因组编辑,血友病B病理模型小鼠表达出具有功能活性的人IX因子示意图

比, 没有显著差异。

为了评价所用方法的特异性, 作者对小鼠基因组内20个最可能的F9 ZFNs脱靶位点(off-target sites)作进一步分析, 其中, 19个位点检测不到断裂。在定位于小鼠染色体9qE3.1基因间区的第20个位点处, 检测到的断裂频率为F9靶位点的十分之一, 说明打靶位点特异性很强。

该研究向我们展示了概念性的成果, 对临床应用人工设计的工程核酸酶进行基因治疗及改造因疾病而受累的细胞具有重要意义。通过AAV导入ZFNs和同源性打靶模板可以达到体内原位基因打靶或基因组编辑的目的。但这些研究成果在临床转化之前, 仍有许多安全性和有效性的问题需要解决, 例如: 基因突变矫正效率的优化、人类基因组脱靶效应的筛查、ZFNs的毒性等。但可以预见, 在体编辑基因组DNA可能成为基因打靶或原位改造遗传性疾病的一种有效策略。

### 3 结束语

利用经典的同源重组技术、核酸酶结合同源重组技术, 已有实现基因替代治疗(gene replacement therapy)的成功范例。除上述在血友病小鼠模型上重建凝血功能之外, 2007年Hanna等<sup>[4]</sup>利用人源化镰刀型红细胞贫血病模型的小鼠成纤维细胞, 通过转染Yamanaka因子建立了iPS, 再经基因打靶技术获得β镰刀型突变矫正的iPS, 进一步分化为造血干细

胞, 移植给疾病小鼠, 这种基因联合细胞治疗的方式显著改善了小鼠的贫血。2008年Perez等<sup>[5]</sup>利用针对CCR5基因序列的锌指核酸酶(CCR5 ZFNs), 特异性地减少CD4+ T细胞上的HIV-1共受体CCR5的表达, 体外和体内研究都表明CCR5 ZFNs修饰的CD4+ T细胞能够有效抵制HIV-1的感染。通过利用ZFNs和TALENs这两种人工核酸酶的优势, 改进它们的不足之处, 相信这项技术将为物种改造、人类疾病的治疗带来巨大的潜力和希望。

### 参考文献 (References)

- 1 Li H, Haurigot V, Doyon Y, Li T, Wong SY, Bhagwat AS, *et al.* *In vivo* genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* 2011; 475(7355): 217-21.
- 2 Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, *et al.* Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods* 2011; 8(1): 67-9.
- 3 Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011; 29(2): 143-8.
- 4 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Casasady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 5 Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, *et al.* Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 808-16.

---

### 勘误声明

2011年33卷第7期第830页右栏第17行原文“人羊上皮膜细胞”, 应为“人羊膜上皮细胞”, 特此更正。