

## 领域前沿 · 中国



仇子龙, 现任中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所研究员、博士生导师。1998年毕业于上海交通大学生物科学与技术系, 2003年在中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所获得博士学位, 2003至2009年在美国加州大学圣迭戈分校神经生物学系从事博士后研究, 2009年7月受聘中国科学院上海神经科学研究所研究员、课题组长。获得中国科学院百人计划择优、科技部973及中国科学院战略先导专项等支持, 2014年入选中国科学院脑科学卓越创新中心。从事自闭症的神经生物学研究, 研究工作主要集中在与自闭症及瑞特综合征等发育性神经系统疾病关系密切的基因 *MECP2* (methyl-CpG binding protein 2) 上, 主要工作包括: (1) 发现 *MECP2* 蛋白直接影响核内小RNA剪切加工复合物的活性而调控神经元内小RNA的产生, 提出了发育性神经系统疾病致病机理的新观点 (Cheng *et al.* Dev Cell 2014); (2) 发现 *MECP2* 蛋白可被小泛肽化 (SUMOylation) 修饰而影响转录调控功能与突触发育 (Cheng *et al.* J Neurochem 2014); (3) 应用TALEN基因编辑方法得到敲除 *MECP2* 基因的食蟹猴, 建立了食蟹猴基因编辑系统, 为在非人灵长类中建立自闭症模型、深入研究自闭症的神经机理打下重要基础 (Liu *et al.* Neurosci Bull 2014); (4) 应用慢病毒转基因方法得到慢病毒介导的转基因方法成功获得了8只存活的携带人类 *MECP2* 基因的转基因食蟹猴, 系统性的分析了 *MECP2* 转基因食蟹猴的行为表型, 发现 *MECP2* 转基因食蟹猴表现出多种自闭症患者的症状, 如重复刻板行为、社交障碍及升高焦虑水平等, 系国际首次建立精神疾病的基因工程非人灵长类动物模型, 为自闭症的病理与转化研究提供重要动物模型 (Liu *et al.* Nature 2016)。

## 当猴子患上了自闭症

李 霄 仇子龙\*

(中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所神经科学国家重点实验室,  
中国科学院脑科学卓越创新中心, 上海 200031)

**摘要** 自闭症是一种遗传相关的神经系统发育性疾病, 患者会表现出社交行为障碍、重复性刻板行为等异常。在导致自闭症的众多基因中, 甲基化CpG岛结合蛋白2基因 (methyl-CpG binding protein 2, *MECP2*) 是一个具有特殊性质的基因, 当 *MECP2* 失活时会导致瑞特综合征; 而当 *MECP2* 过表达时则会导致 *MECP2* 倍增综合征。通过慢病毒注射的方法, 研究人员成功建立了一种神经特异性过表达 *MECP2* 的转基因食蟹猴模型, 该模型表现出重复性刻板行为以及社交行为障碍等一系列与自闭症类似的表征, 并且外源基因的插入和社交异常能够遗传到通过精巢移植产生的子代上。该模型为自闭症的深度研究提供了坚实基础, 并为自闭症的临床治疗提供了良好的实验平台。

**关键词** 自闭症; *MECP2*; 转基因食蟹猴; 行为学检测; 种系传递

\*通讯作者。Tel: 021-54921806, E-mail: zqiu@ion.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921806, E-mail: zqiu@ion.ac.cn

网络出版时间: 2016-03-15 16:53:20

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160315.1653.010.html>

## When the Monkey Suffer from Autism

Li Xiao, Qiu Zilong\*

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

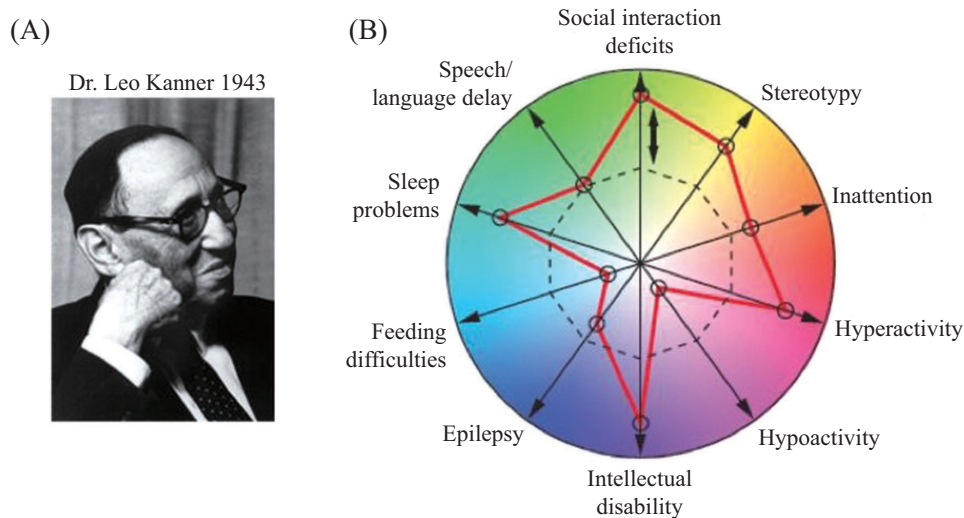
**Abstract** Autism is a genetic nervous system developmental diseases, patients show abnormal behaviors such as social behavior disorders, repetitive stereotyped behavior and so on. In multiple genes that can cause autism, methyl-CpG-binding protein 2 (*MECP2*) is one with special characteristics, loss of function of *MECP2* can cause Rett syndrome, while over expression of *MECP2* can lead to *MECP2* duplication syndrome. By using lentivirus injection, researchers had successfully established a transgenic crab-eating monkey model that over expressing *MECP2* only in nervous system. This model also represented autism-like behaviors such as stereotyped behavior and social deficiencies and so on. The insertion sites of transgene and abnormal behaviors can be passed to F1 generation by germline transmission. These results provide a solid basis for autism further study and a good experiment platform for the clinical treatment of autism.

**Keywords** autism; *MECP2*; transgenic monkey; behavior detection; germline transmission

在普罗大众的印象中, 自闭症像是一种性格标签, 可以不吝惜地贴在了那些不善社交、少与别人交流、性情内向的人的身上。然而对于医学和神经科学相关的专业人士而言, 自闭症却并不是一张意如其名的标签, 能够轻易地贴出来。

自闭症的首次临床定义是在20世纪40年代由美国医生Kanner提出的(图1A)<sup>[1]</sup>, 经过几十年来的发展, 专业领域一般认为, 自闭症(autism)是一类广泛性的神经系统发育性疾病<sup>[2]</sup>, 包括: 瑞特综合征(Rett

syndrome)、阿斯伯格综合征(Asperger syndrome)、童年瓦解性障碍等病症。由于是发育性疾病, 所以患者从婴幼儿便开始发病<sup>[3]</sup>, 主要的病因则是会影响到发育过程的遗传、免疫、孕期理化因子刺激等因素。患者的临床表现主要在: (1)对父母不产生依恋, 不能与同龄儿童建立伙伴关系等此类社会交往行为的障碍<sup>[4]</sup>; (2)无法用动作表达自己意愿, 语言运用和理解能力缺失等此类交流性障碍<sup>[5]</sup>; (3)无法对玩具感兴趣, 重复蹦跳、重复机械性动作等此类



Huguet *et al.* Annu Rev G&HG 2013

图1 首次对自闭症做出临床定义的Kanner医生(A)及自闭症患者的临床表型(B)

Fig.1 Doctor Kanner who made clinical definition of autism for the first time (A) and clinical phenotype in autism patients (B)

兴趣缺失及重复刻板性行为<sup>[6]</sup>, 另有少量病患出现癫痫、智力低下、个体发育迟缓等较严重病症(图1B)。

近几十年来, 随着生命科学的日新月异, 对于自闭症的研究和理解也越来越深入, 从早期的临床病理层面, 逐步深入到细胞以及分子的病理层面, 使得人们对于自闭症的发生、病程进展以及治疗有了更全面和精细的了解。目前的研究结果显示, 自闭症并不是神经系统严重的、明显的损伤, 而与神经系统的发育过程以及功能具有相关性, 其中最重要的则是与神经突触功能与调节息息相关<sup>[7]</sup>。对于神经系统而言, 神经元是此系统的核心, 也是最基本的功能单位。神经元彼此之间相互连接才能顺畅地传递神经信号, 完成最基本的神经功能。而神经元彼此之间的连接阵列, 构成了行使高级神经活动的基础。在此, 神经元间相互连接的界面被称为神经突触<sup>[8-10]</sup>, 由此可以理解突触对于神经系统的重要性。有趣的是, 神经元间的连接并不是静态的, 而是一直处于动态变化当中, 旧的不需要的突触消失, 新的突触又形成, 在这个此消彼长的过程中, 消失与形成却不是随机的, 而是处于精密的调控机制操纵之下<sup>[11-15]</sup>。那些与突触这个微小却又重要的结构

以及调控这个结构消亡产生相关的生命源代码——基因, 毫无疑问, 也与自闭症有着密切而重要的联系(图2)。

在这些相关的基因中, 一个名叫甲基化CpG岛结合蛋白2(methyl-CpG-binding protein 2, *MECP2*)的基因, 以其有趣的特征吸引了研究者的注意。*MECP2*基因编码一种甲基化DNA结合蛋白, 它虽然不直接参与到神经突的结构和功能中, 但却可以通过结合DNA的甲基化CpG岛或是招募转录因子来操纵与神经突触功能及调控相关基因的表达<sup>[16-19]</sup>, 从而间接地对神经功能造成影响。当*MECP2*基因因突变或者缺失丧失功能时, 可导致Rett syndrome此类自闭症<sup>[20]</sup>; 而当*MECP2*由于复制异常而导致拷贝数增多时, 却又会导致另一类被称为*MECP2*倍增综合征(*MECP2* duplication syndrome)的自闭症<sup>[21]</sup>。由此可见, 体内*MECP2*这个基因的表达量如同一座天平, 必须保持着精妙的平衡, 无论过多或者过少, 都会引起神经突触及神经系统功能的异常, 从而导致自闭症(图3)。

然而, 仅仅知道了遗传背景和分子机制, 对于治疗自闭症还是远远不够的。如何为发病过程提供一个观察窗口以及为治疗方案提供一个测试平台也

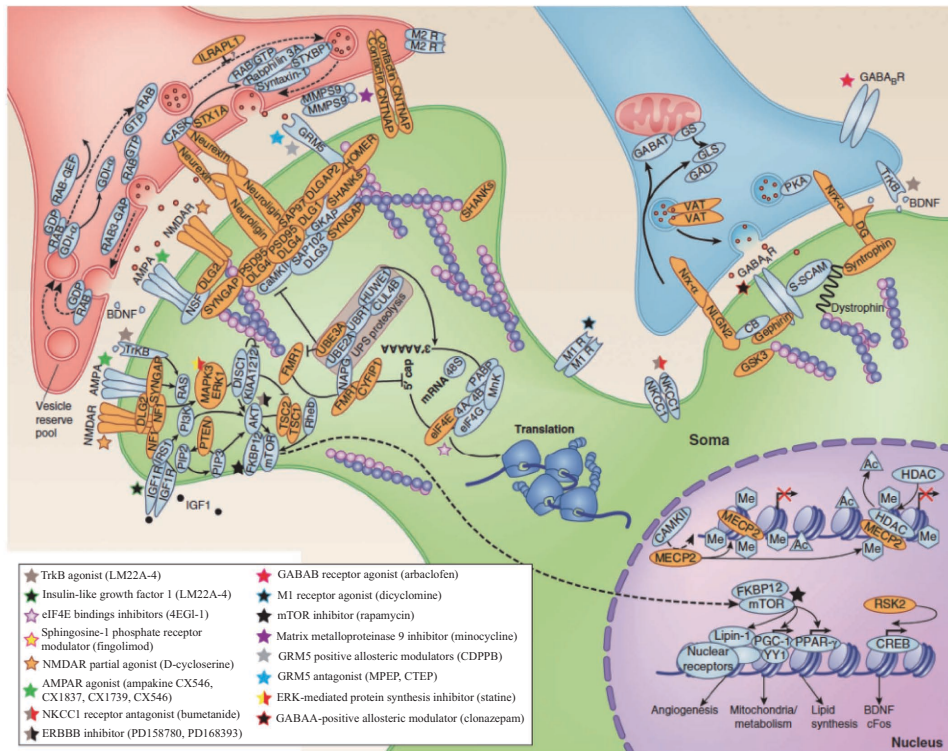
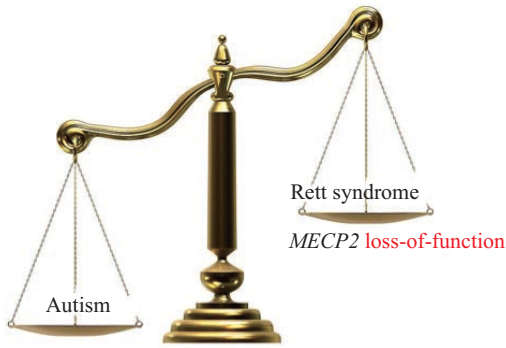


图2 与自闭症相关的突触功能和调控基因

Fig.2 Genes that regulated synaptic function which associated with autism





*MECP2* gain-of-function

图3 *MECP2*表达量必须维持精妙的平衡以保证神经系统的功能正常

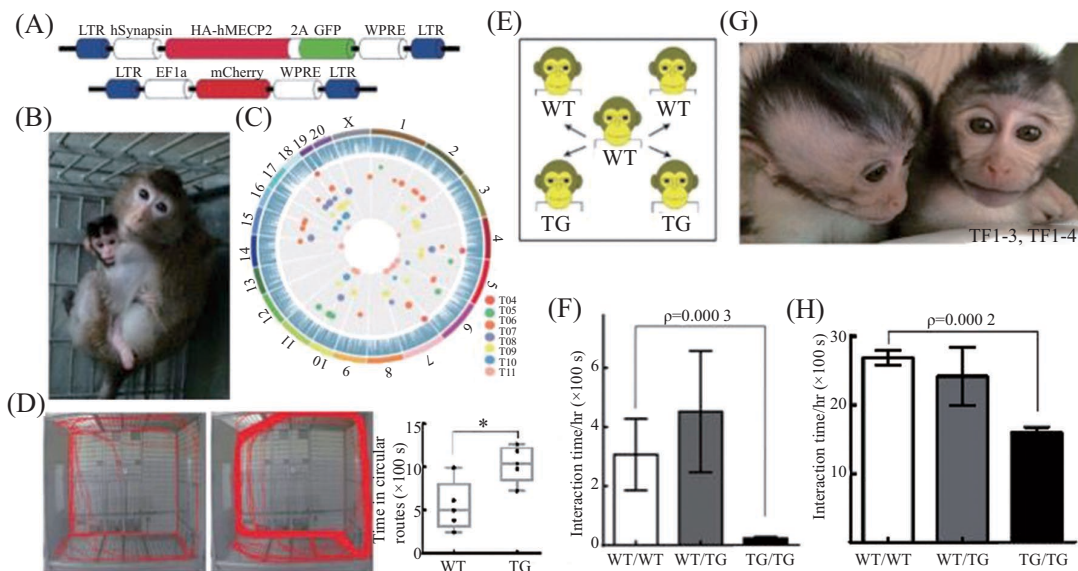
**Fig.3 Expression quantity of *MECP2* must maintain a delicate balance to ensure the functioning of nervous system**

是非常重要的。近年来,基因编辑技术及模式动物的发展对此提供了非常有利的条件。现有的研究结果已经报道了*MECP2*基因敲除的小鼠模型,该模型的确展现出与瑞特综合征非常相似的表型,为瑞特综合征的观察和治疗提供了便利;同时,*MECP2*转基因(过表达)的小鼠模型也同样已得到建立,该模型也展现出明显的社交功能障碍。但自闭症毕竟涉及多种复杂的高级神经活动,如果要为临床研究与治疗提供更为有力的支持,小鼠已显得捉襟见肘,更高级

的动物模型和更复杂的神经系统是非常必要的<sup>[22-23]</sup>。

为了解决这个问题,中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所的仇子龙研究组和苏州灵长类平台通过使用慢病毒载体侵染带入外源基因的方法(图4A),成功地建立了在神经系统中特异性过表达*MECP2*基因的转基因食蟹猴模型(图4B)。通过分子生物学和生物化学方法的鉴定,外源的*MECP2*基因有效地插入了食蟹猴的基因组中(图4C),并且能够只在神经系统中进行表达。

遗传学层面的操作已经成功,种子既已种下,会在食蟹猴这一非人灵长类动物的土壤中结出怎样的果实呢?转基因食蟹猴相对于野生型的对照食蟹猴又会展现出怎样的不同呢?带着这样的疑问,研究人员们对此模型进行了长期的体征观察和大量的行为学测试,结果是非常有趣的。在体征观察与记录中,*MECP2*转基因食蟹猴表现出明显的体重发育迟缓以及血浆中脂肪酸代谢的异常,这两种表型也见于对*MECP2*倍增综合症患者的临床表现的报道中。而在行为方面,对单只食蟹猴进行行动路线追踪的结果显示,转基因食蟹猴会花费更多的时间在一一种刻板的重复性路径行进上(图4D)。而当人为的给予转基因食蟹猴威胁性刺激时<sup>[24]</sup>,相对于野生型



A: 病毒载体中外源转基因片段的设计方案; B: 在母亲照看下的新生F0代转基因食蟹猴; C: 深度测序得到的转基因插入位点的全基因组 Mapping; D: 行动路线追踪结果示意及重复路径时间结果统计,  $P < 0.05$ ; E: 社群内社交行为检测的行为学范式; F: F0代配对社交行为测试的结果; G: 新生的F1代转基因食蟹猴; H: F1代配对社交行为测试结果。

A: lentiviral expression cassette; B: image of newborn *MECP2* transgenic monkey; C: genome-wide distribution of transgenes in F0 TG monkeys; D: alterations in locomotion activity,  $P < 0.05$ ; E: paradigm of social test within group; F: interaction time of social test within pair of F0; G: image of newborn F1 *MECP2* transgenic monkey; H: interaction time of social test within pair of F1.

图4 携带人类*MECP2*基因的转基因后表现类自闭症症状(根据参考文献[29]修改)

**Fig.4 Transgenic monkeys carrying human *MECP2* gene exhibit autism-like phenotypes (modified from reference [29])**

对照, 该型食蟹猴会表现出更强烈的焦虑情绪与敌意。在最为重要社交行为及能力方面, 研究人员发现, 无论是在社群内的社交行为(图4E)还是与另一只配对的社交行为, 转基因食蟹猴的社交频率统计结果均显著的低于野生型对照(图4F), 该结果对于评估 *MECP2* 转基因食蟹猴的类自闭症表型具有重要的意义。在此之后, 研究人员又通过威斯康星通用仪器测试对转基因食蟹猴的学习能力进行了评估<sup>[25-26]</sup>, 在该项实验中, 转基因食蟹猴并没有表现出明显的学习障碍, 但却出现了被认为是自闭症表征的重复刻板行为。

在自闭症中, 遗传是一项重要因素, 而作为致病基因已明确的 *MECP2* 倍增综合征, 遗传影响的重要性不言而喻。为了深入地研究此问题, 研究人员将转基因食蟹猴的精巢组织移植至裸鼠皮下并使用激素促进成熟, 成功地在短期内得到了原代转基因食蟹猴(F0)的子代猴(F1)(图4G)<sup>[27]</sup>, 经过遗传学检测, 研究人员们发现, F0代转基因食蟹猴基因组中的外源插入片段的位点, 通过种系传递<sup>[28]</sup>, 遗传至F1代子猴的基因组中<sup>[28]</sup>, 并且F1代子猴中位点的分布与F0代比较, 呈现出典型的孟德尔分离现象。此结果显示, F1子代猴从亲代F0身上遗传到了神经系统中特异性过表达 *MECP2* 的特性, 并且针对于F1的配对社交行为检测结果也显示, 转基因食蟹猴相较于野生型对照也展现出社交行为频率的显著下降(图4H), 该表型与F0亲代猴以及自闭症患者的临床表型是相似的。

综合以上的结果, 在该项目中, 仇子龙研究与苏州灵长类平台成功地建立了神经系统特异性表达 *MECP2* 的转基因食蟹猴模型, 且该转基因可以通过种系传递向子代进行遗传。无论是F0还是F1, *MECP2* 的异常表达都导致了转基因食蟹猴出现明显的类自闭症行为, 简而言之, 作为与人类亲缘关系很近的猴子患上了自闭症。该项工作为观察自闭症的病程进展提供了一扇很好的窗口, 并为之后进一步研究自闭症的机制提供了坚实的基础, 也为自闭症的临床治疗提供了良好的动物模型和试验平台。

### 参考文献 (References)

- 1 Kanner L. Citation classic-autistic disturbances of affective contact. *Cc/Soc Behav Sci* 1979; 14-14 .
- 2 Caronna EB, Milunsky JM, Tager-Flusberg H. Autism spectrum disorders: Clinical and research frontiers. *Arch Dis Child* 2008; 93(6): 518-23.

- 3 Myers SM, Johnson CP, American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 2007; 120(5): 1162-82.
- 4 Rapin I, Tuchman RF. Autism: Definition, neurobiology, screening, diagnosis. *Pediatr Clin N Am* 2008; 55(5): 1129-46.
- 5 Noens I, van Berckelaer-Onnes I, Verpoorten R, van Duijn G. The ComFor: An instrument for the indication of augmentative communication in people with autism and intellectual disability. *J Intell Disabil Res* 2006; 50(Pt 9): 621-32.
- 6 Lam KS, Aman MG. The Repetitive Behavior Scale-Revised: Independent validation in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 2007; 37(5): 855-66.
- 7 Delorme R, Ey E, Toro R, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat Med* 2013; 19(6): 685-94.
- 8 Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, *et al.* Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 2009; 513(5): 532-41.
- 9 Herculano-Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(Suppl 1): 10661-8.
- 10 Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: A linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* 2009; 3: 31.
- 11 Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex-an electron microscope study. *J Anat* 1959; 93: 420-33.
- 12 Chang HT. Cortical neurons with particular reference to the apical dendrites. *Cold Spring Harb Sym* 1952; 17: 189-202.
- 13 Yuste R. Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 2013; 36: 429-49.
- 14 Harris KM, Weinberg RJ. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(5): a005587.
- 15 Sheng M, Kim E. The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(12): a005678.
- 16 Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 1989; 58(3): 499-507.
- 17 Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 1997; 88(4): 471-81.
- 18 Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, *et al.* Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(49): 17551-8.
- 19 Cheng TL, Wang Z, Liao Q, Zhu Y, Zhou WH, Xu W, *et al.* MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex. *Dev Cell* 2014; 28(5): 547-560.
- 20 Amir RE, van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23(2): 185-8.
- 21 Ramocki MB, Peters SU, Tavyev YJ, Zhang F, Carvalho CM, Schaaf CP, *et al.* Autism and other neuropsychiatric

- symptoms are prevalent in individuals with MECP2 duplication syndrome. *Ann Neurol* 2009; 66(6): 771-782.
- 22 Samaco RC, Mandel-Brehm C, McGraw CM, Shaw CA, McGill BE, Zoghbi HY. Crh and Oprm1 mediate anxiety-related behavior and social approach in a mouse model of MECP2 duplication syndrome. *Nat Genet* 2012; 44(2): 206-11.
- 23 Collins AL, Levenson JM, Vilaythong AP, Richman R, Armstrong DL, Noebels JL, *et al.* Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet* 2004; 13(21): 2679-89.
- 24 Kalin NH, Shelton SE. Defensive behaviors in infant rhesus-monkeys-environmental cues and neurochemical regulation. *Science* 1989; 243(4899): 1718-21.
- 25 Golub MS, Hogrefe CE, Germann SL. Iron deprivation during fetal development changes the behavior of juvenile rhesus monkeys. *J Nutr* 2007; 137(4): 979-84.
- 26 Makori N, Watson RE, Hogrefe CE, Lalayeva N, Oneda S. Object discrimination and reversal learning in infant and juvenile non-human primates in a non-clinical laboratory. *J Med Primatol* 2013; 42(3): 147-57.
- 27 Liu Z, Nie YH, Zhang CC, Cai YJ, Wang Y, Lu HP, *et al.* Generation of macaques with sperm derived from juvenile monkey testicular xenografts. *Cell Res* 2016; 26: 139-142.
- 28 Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, *et al.* Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 2009; 459(7246): 523-7.
- 29 Liu Z, Li X, Zhang JT, Cai YJ, Cheng TL, Cheng C, *et al.* Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* 2016; 530(7588): 98-102.