

【述评】

管丽红 林俊堂

2015 年, Makarova 等^[7]将 CRISPR-Cas 系统分为 2 大类 5 种类型。1 类(Class 1)系统包含 I 型(Type I)、Ⅲ型(Type Ⅲ)和Ⅳ型(Type Ⅳ);2 类(Class 2)系统包含Ⅱ型(Type Ⅱ)和Ⅴ型(Type Ⅴ)。由于Ⅱ型 CRISPR-Cas 系统中行使核酸切割功能的蛋白只有 Cas9, 因此, 经改造之后, CRISPR-Cas9 技术被广泛用于不同物种的基因组编辑和疾病治疗^[8]。本文主要综述 CRISPR-Cas9 技术在构建眼科疾病模型和治疗眼科疾病中的应用。

1 CRISPR-Cas9 技术在构建眼科疾病模型中的应用

自 CRISPR-Cas9 系统被改造为一种由 RNA 引导核酸内切酶的基因编辑技术之后,CRISPR-Cas9 技术被成功用于癌症^[9]、白化病^[10]和衰老^[11]等多种疾病模型的构建,下面主要介绍 CRISPR-Cas9 技术在构建眼科疾病模型中的应用。

1.1 成视网膜细胞瘤 成视网膜细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是由 Retinoblastoma 1 (Rb1) 双等位基因失活导致的一种遗传性儿童眼部肿瘤^[12]。由于缺少临床前研究模型,尽管近年来 RB 的药物治愈率有所增加,但目前尚无可用的分子靶向治疗。Naert 等^[13]试图利用 CRISPR-Cas9 技术构建非洲爪蟾的 RB 模型。结果显示,与小鼠的研究相似,Rb1 或 Retinoblastoma-like 1 (Rbl1) 基因突变的非洲爪蟾发育正常并且不能形成肿瘤;而 Rb1 和 Rbl1 基因同时发生突变,则导致蝌蚪和幼蛙出现 RB 和脑瘤。该研究首次建立了非哺乳类的 RB 模型,为研究该疾病的分子治疗提供可用模型。

1.2 白内障 以晶状体混浊为特征的先天性白内障是儿童失明的主要原因,10 000 个新生儿中有 0.6~6.0 个出现先天性失明^[14]。

晶状体特异间隙连接蛋白 GJA1、GJA3 和 GJA8 在从高代谢活性细胞向低代谢活性细胞传递信息的过程中起至关重要的作用。因此,编码这 3 个蛋白的基因是脊椎动物晶状体发育和功能的重要基因^[15]。Yuan 等^[16]利用 CRISPR-Cas9 技术成功敲除家兔的 GJA8 基因,导致家兔出现小眼、小晶状体和白内障的症状。这一新型的家兔白内障模型成为预防和治疗白内障重要的药物筛选工具。

晶状体家族基因 α -crystallin (CRYAA) 和 α B-crystallin (CRYAB) 的突变能够引起先天性白内障^[17-18]。其中,CRYAA 基因在晶状体内高表达,并参与维持其结构和透明度。Yuan 等^[19]将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 共注射到家兔受精卵中,成功敲除了 CRYAA 基因,构建了具有先天性白内障、小眼、视力模糊、晶状体萎缩和晶状体纤维不分化等表型的家兔白内障模型。这一研究为进一步探讨 CRYAA 基因突变与人类先天性白内障之间的关系提供了新的动物模型。

2 CRISPR-Cas9 技术在治疗眼科疾病中的应用

CRISPR-Cas9 技术最具前景的应用是对遗传疾病的基因治疗,目前,该技术已成功用于杜氏肌营养不良症^[20]、血友病^[21]、酪氨酸血症^[22]和亨廷顿舞蹈症^[23]等多种遗传疾病的基因治疗,下面主要介绍 CRISPR-Cas9 技术在眼科疾病中的应用。

2.1 色素性视网膜炎 色素性视网膜炎 (retinitis

pigmentosa, RP) 是一类遗传性视网膜退行性疾病,包括常染色体隐性遗传、常染色体显性遗传和伴 X 染色体连锁遗传 3 种,该病的主要特征是进行性光感受器细胞丧失导致视网膜变性萎缩^[24]。目前,临床中尚无有效治疗 RP 的方法。近年来,CRISPR-Cas9 技术的发展给治疗 RP 带来了新希望。

“rodless” (rd1) 小鼠是临床前研究 RP 常用的常染色体隐性遗传模型,这种小鼠的 Pde6b 基因上有 2 个突变位点:一个是无义突变位点 (Y374X),另一个是白血病毒的内含子插入突变 (Xmv-28)。目前,尚无确切证据表明哪一个突变位点是导致 RP 的关键原因。Wu 等^[25]选择 rd1 小鼠作为研究对象,试图利用 CRISPR-Cas9 技术修复 Pde6b 基因的 Y374X 突变,达到治疗 RP 的目的。在该研究中,F0 代的 Y374X 修复小鼠视网膜结构恢复正常,并且视网膜电流图显示出生后 30 d (P30) 的 Y374X 修复小鼠在视杆、视锥和视杆视锥反应中的表现与野生型小鼠相似。这一研究证明,CRISPR-Cas9 基因治疗技术可有效修复 rd1 小鼠的临床症状。此外,该研究还间接证明 Y374X 突变位点是导致 RP 的关键原因。

视紫红质 (Rho) 基因编码的视杆受体蛋白与视网膜结合能够感受到光,并且启动视杆光感受器的光传导级联反应^[26]。大鼠 Rho 基因 S334ter 突变 (RhoS334) 是一种常染色体显性遗传的 RP 模型。RhoS334 突变使大鼠出现与人的 I 型 RHO 相似的持续光感受器损失和视力下降。Bakondi 等^[27]将特异性 sgRNA 和 Cas9 注射到出生后 0 d (P0) 的 RhoS334 突变大鼠单侧视网膜下,并利用电穿孔法使其进入细胞内,从而选择性地消除携带显性 RhoS334 突变的等位基因导致的影响。小鼠 Rho 基因的 P23H 突变也是一种常染色体显性遗传的 RP 模型。Giannelli 等^[28]利用 CRISPR-Cas9 技术选择性地消除小鼠 Rho 基因的 P23H 突变,从而改善了视网膜的功能。由此可见,在活体内利用 CRISPR-Cas9 技术选择性地消除 Rho 基因突变可以阻止遗传性视网膜变性。

RPGR 基因突变能够导致 X 染色体连锁遗传的 RP。Bassuk 等^[29]将从 X 染色体连锁遗传的 RP 患者皮肤活检组织中获得的携带 RPGR 基因 c. 3070G>T 突变的成纤维细胞诱导为多能干细胞 (iPSCs),利用 CRISPR-cas9 技术将 sgRNAs、Cas9 和一段同源模板转入 iPSCs,最终发现,13% 的 RPGR 基因得到修正,并转化为野生型等位基因。这一研究将患者来源的 iPSCs 经基因编辑用于视网膜移植,为治疗遗传性 RP 提供了前期基础。

2.2 Leber 先天性黑矇 10 Leber 先天性黑矇 10 (Leber congenital amaurosis 10, LCA10) 是由 Cep290 基因内含子突变导致的一种严重的视网膜营养不良性疾病,该基因突变导致产生一种可变剪接位点,使得一半细胞内的该基因编码时出现提前终止密码

子^[30]。Ruan 等^[31]利用双 AAV 系统介导的 CRISPR-Cas9 技术将小鼠视网膜 Cep290 基因内含子的突变位点删除。该研究为治疗 LCA10 提供了潜在的方法。

2.3 原发性开角型青光眼 原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)是全球不可逆视力丧失的主要原因之一,高眼压是其主要危险因素。MYOC 基因突变使蛋白质错误折叠,造成调节眼压的小梁网的内质网压力增加,导致常染色体显性遗传的 POAG^[32]。Jain 等^[33]利用 CRISPR-Cas9 技术在 MYOC 基因突变的小鼠 POAG 模型中降低 MYOC 突变基因的表达,从而减缓了小梁网的内质网压力,降低眼压,阻止了进一步的青光眼损伤。此外,该研究应用体外人体器官培养系统证明了该方法治疗人类青光眼的可行性。

2.4 白内障 小鼠 Crygc 基因 3 号外显子 1 碱基的突变可导致显性遗传的白内障^[34]。Wu 等^[35]利用该小鼠作为模型,将特异的 sgRNA、Cas9 mRNA 和外源的供体 DNA 共注射到受精卵中,修复了 Crygc 基因的突变,治愈了小鼠的白内障,并且可以稳定遗传给后代。该研究为利用 CRISPR-Cas9 技术治疗遗传性疾病提供了可靠证据。

3 结语与展望

CRISPR-Cas9 技术在构建疾病模型中的应用广泛,但在治疗疾病方面仍主要停留在动物水平。尽管 CRISPR-Cas9 技术有很多优势,但仍存在一定的缺陷,例如脱靶效率难以避免^[36]。另外,由于伦理学问题,近期该技术较难直接应用于人类疾病的治疗中。因此,寻找更加安全高效的基因编辑手段将有助于推动基因治疗研究的发展。

致谢:感谢韩亚伟博士、乔梁博士和李小英老师对本文的建议与修改!

参考文献

[1] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product[J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12):5429-5433.

[2] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, SCHOOLS L M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6):1565-1575.

[3] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, EHRLICH S D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8):2551-2561.

[4] MOJICA F J, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, SORIA E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. *J Mol Evol*, 2005, 60(2):174-182.

[5] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 3):653-663.

[6] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYVAVAL P, MOINEAU S. CRISPR provides acquired resist-

ance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819):1709-1712.

[7] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, COSTA F, SHAH S A, SAUNDERS S J, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11):722-736.

[8] WILKINSON R, WIEDENHEFT B. A CRISPR method for genome engineering[J]. *F1000Prime Reports*, 2014, 6:3.

[9] PLATT R J, CHEN S, ZHOU Y, YIM M J, SWIECH L, KEMP-TON H R, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling[J]. *Cell*, 2014, 159(2):440-455.

[10] MIZUNO S, DINH T T, KATO K, MIZUNO-IJIMA S, TANIMOTO Y, DAITOKU Y, 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):327-334.

[11] HAREL I, BENAYOUN B A, MACHADO B, SINGH P P, HU C K, PECH M F, et al. A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate[J]. *Cell*, 2015, 160(5):1013-1026.

[12] BENAVENTE C A, DYER M A. Genetics and epigenetics of human retinoblastoma[J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10:547-562.

[13] NAERT T, COLPAERT R, VAN NIEUWENHUYSEN T, DIMITRAKOPOULOU D, LEOEN J, HAUSTRAETE J, et al. CRISPR/Cas9 mediated knockout of rbl and rbl1 leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in Xenopus tropicalis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35264.

[14] REDDY M A, FRANCIS P J, BERRY V, BHATTACHARYA S S, MOORE A T. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes[J]. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49(3):300-315.

[15] GONG X, CHENG C, XIA C H. Connexins in lens development and cataractogenesis[J]. *J Membr Biol*, 2007, 218(1-3):9-12.

[16] YUAN L, SUI T, CHEN M, DENG J, HUANG Y, ZENG J, et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:22024.

[17] LITT M, KRAMER P, LAMORTICELLA D M, MURPHEY W, LOVRIEN E W, WELEBER R G. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA[J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(3):471-474.

[18] JIAO X, KHAN S Y, IRUM B, KHAN A O, WANG Q, KABIR F, et al. Missense mutations in CRYAB are liable for recessive congenital cataracts[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0137973.

[19] YUAN L, YAO H, XU Y, CHEN M, DENG J, SONG Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of alphaA-crystallin gene induces congenital cataracts in rabbits[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(6):BIO34-BIO41.

[20] LONG C Z, MCANALLY J R, SHELTON J M, MIREAULT A A, BASSEL-DUBY R, OLSON E N. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA[J]. *Science*, 2014, 345(6201):1184-1188.

[21] GUAN Y, MA Y, LI Q, SUN Z, MA L, WU L, et al. CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(5):477-488.

[22] YIN H, XUE W, CHEN S, BOGORAD R L, BENEDETTI E, GROMPE M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6):551-553.

[23] YANG S, CHANG R, YANG H, ZHAO T, HONG Y, KONG H E, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(7):2719-2724.

[24] HAMEL C. Retinitis pigmentosa[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1:40.

[25] WU W H, TSAI Y T, JUSTUS S, LEE T T, ZHANG L, LIN C S, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(8):1388-1394.

- healing in experimental glaucoma surgery[J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, 7(2): 226-31.
- [4] LIN Z, LIU X, ZHOU T, WANG Y, BAI L, HE H, *et al*. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride[J]. *Mol Vis*, 2011, 17(17): 257.
- [5] PAULY A, BROGNOLE-BAUDOUIN F, LABBE A, LIANG H, WARNET J M, BAUDOUIN C. New tools for the evaluation of toxic ocular surface changes in the rat[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12): 5473-5483.
- [6] FAN Z C, XUE Y L, LI S X, LV D F, HAN X S, ZHAN G. Application of montmorillonite pharmacy[J]. *Fine Spec Chem*, 2007, 15(6): 29.
- 樊志成, 薛云丽, 李世旭, 吕大丰, 韩秀山, 湛刚. 蒙脱石在医药中的应用[J]. *精细与专用化学品*, 2007, 15(6): 29.
- [7] CARRETERO M I, POZO M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry: Part I. Appl[J]. *Clay Sci*, 2009, 46, 73-80.
- [8] CHO B C, PARK J W, BAIK B S, KIM I S. Clinical application of injectable calcium sulfate on early bony consolidation in distraction osteogenesis for the treatment of craniofacial microsomia[J]. *J Craniofac Surg*, 2002, 13(3): 465-475.
- [9] AUSTIN P S, DOUGHMAN D J. Reaction to intraocular penetration of bentonite[J]. *Am J Ophthalmol*, 1980, 89(5): 719-723.
- [10] LI W, CHEN Y T, HAYASHIDA Y, BLANCO G, KHEIRKAH A, HE H, *et al*. Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases[J]. *J Pathol*, 2008, 214(1): 114-122.
- [11] BRAUN R J, KING-SMITH P E, BEGLEY C G, LI L, GEWECKE N R. Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 45(10): 132-164.
- [12] LI L, BRAUN R J, MAKI K L, HENSHAW W D, KING-SMITH P E. Tear film dynamics with evaporation, wetting, and time-dependent flux boundary condition on an eye-shaped domain[J]. *Phys Fluids*, 2014, 26(5): 69-87.
- [13] TODA I, FUJISHIMA H, TSUBOTA K. Ocular fatigue is the major symptom of dry eye[J]. *Acta Ophthalmol*, 1993, 71(3): 347-352.
- [14] NICHOLS K K, NICHOLS J J, MITCHELL G L. The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease[J]. *Cornea*, 2004, 23(8): 762-770.
- [15] STERN M E, SCHAUMBURG C S, DANA R, CALONGE M, NIEDERKORN J Y, PFLUGFELDER S C, *et al*. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation[J]. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(5): 425.
- [16] YANG C H, ALBIETZ J, HARKIN D G, KIMLIN M G, SCHMID K L. Impact of oral vitamin D supplementation on the ocular surface in people with dry eye and/or low serum vitamin D[J]. *Cont Lens Anterior Eye*, 2018, 41(1): 69-76.
- [17] AKTAŞ S, TETIKÖĞLU M, KOÇAK A, KOCACAN M, AKTAŞ H, SAĞDIK H M. Impact of smoking on the ocular surface, tear function, and tear osmolarity[J]. *Curr Eye Res*, 2017(2): 1.
- [18] GIBSON E J, STAPLETON F, WOLFFSOHN J S, Golebiowski B. Local synthesis of sex hormones: are there consequences for the ocular surface and dry eye[J]? *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(12): 1596-1603.

(上接第 803 页)

- [26] SUNG C H, CHUANG J Z. The cell biology of vision[J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(6): 953-963.
- [27] BAKONDI B, LV W, LU B, JONES M K, TSAI Y, KIM K J, *et al*. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the s334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 556-563.
- [28] GIANNELLI SG, LUONI M, CASTOLDI V, MASSIMINO L, CABBASSI T, ANGELONI D, *et al*. Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9. PHP. B-based delivery[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(5): 761-779.
- [29] BASSUK A G, ZHENG A, LI Y, TSANG S H, MAHAJAN V B. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19969.
- [30] DEN HOLLANDER A I, KOENEKOOP R K, YZER S, LOPEZ I, ARENDS M L, VOESENEK K E, *et al*. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(3): 556-561.
- [31] RUAN G X, BARRY E, YU D, LUKASON M, CHENG S H, SCARIA A. CRISPR/Cas9-Mediated genome editing as a therapeutic approach for leber congenital amaurosis 10[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2): 331-341.
- [32] WIGGS J L, PASQUALE L R. Genetics of glaucoma[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(R1): R21-R27.
- [33] JAIN A, ZODE G, KASETTI RB, RAN F A, YAN W, SHARMA T P, *et al*. CRISPR-Cas9-based treatment of myocilin-associated glaucoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(42): 11199-11204.
- [34] ZHAO L, LI K, BAO S, ZHOU Y, LIANG Y, ZHAO G, *et al*. A 1-bp deletion in the gammaC-crystallin leads to dominant cataracts in mice[J]. *Mamm Genome*, 2010, 21(7-8): 361-369.
- [35] WU Y, LIANG D, WANG Y, BAI M, TANG W, BAO S, *et al*. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-662.
- [36] JAMAL M, ULLAH A, AHSAN M, TYAGI R, HABIB Z, REHMAN K. Improving CRISPR-Cas9 On-Target Specificity[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2018, 26: 65-80.