

# 全球首批带疾病基因克隆猴诞生

## 上海创建世界首例生物节律紊乱体细胞克隆猴模型

2018年1月25日,上海科学家宣布世界首例体细胞克隆猴中中和华华诞生。一年后,“中华”姐妹有了小伙伴——5只生物节律紊乱体细胞克隆猴再次于上海诞生。

中科院神经科学研究所的生物节律与衰老疾病研究组和非人灵长类研究平台经过两年努力,利用CRISPR/Cas9技术,成功构建了世界首例核心节律基因BMAL1敲除猕猴模型。我国顶级综合英文期刊《国家科学评论》昨天凌晨在线发表了两篇该重大成果的研究论文。

青年报记者 郭颖



5只生物节律紊乱体细胞克隆猴在上海诞生。

受访者供图

### 中国科学家首次制作出体细胞基因编辑克隆猴

据悉,自然界中大部分生物,都拥有按时间节奏调节自身活动的本领,称之为生物节律。生物节律系统在维持机体内在的生理功能(如睡眠/觉醒系统、体温、代谢和器官功能等)、适应环境的变化等方面扮演着重要角色。生物节律紊乱与睡眠障碍、神经退行性疾病(如阿尔茨海默病)、精神类疾病(如抑郁症)、糖尿病、肿瘤,以及心血管等疾病密切相关。

小鼠和果蝇等动物模型因其与人的昼夜活动周期、脑结构和代谢速率等存在明显差异,极大地制约了生物节律紊乱机理研究和相关疾病治疗手段的研发,而非人灵长类动物与人类最接近,是研究节律紊乱相关疾病机理和诊治手段比较理想的动物模型,因此建立非人灵长类生物节律紊乱模型迫在眉睫。

“克隆猴最大的意义之一在于我们可以由此批量制造基因编辑的猴子。而之前的中中和华华都是

野生型的猴子,从科研价值上来说,不如基因编辑的猴子那么大。”中科院神经科学研究所唐骋介绍了中中和华华与本次研究所用的克隆猴。

据介绍,科学家先去除猴卵细胞的细胞核,然后在其中放入另一只猴的体细胞核,等待两者充分融合后,再向其中注入Kdm4d的mRNA来帮助克隆胚胎发育,最后将这个核移植过的卵移植到代孕母猴体内等待克隆猴出生。

中中和华华所用到的胎猴体细胞,本身就来自尚未出生的小猴,十分“年轻”,自然活力强大。但是很难直接利用死胎的细胞来制造基因编辑猴,实际制作基因编辑猴所用的细胞比这要“年老”很多,更何况基因编辑本身还会对细胞的DNA造成一些损伤,所以科学家一直担心,经过这么一番折腾后,克隆的成功率会跌到多少。要知道中中和华华的克隆成功率尚不

足1%,而克隆猴成本高昂,如果由此制造基因编辑猴的成功率太低,很可能就会因为成本问题而让这项技术长期停留在纸面上。因此,非常需要真正利用体细胞核移植技术制造出基因编辑的猴子来实践这项技术。

此番中科院神经科学研究所的孙强研究员与刘真研究员、张洪钧研究员合作,3个研究团队经过3年努力,利用CRISPR/Cas9技术成功构建了世界首例核心节律基因BMAL1敲除猕猴模型。

这5只小猴的细胞核基因型与核供体细胞完全一致,而线粒体基因型则与卵供体猴一模一样,同时它们的任何基因与生出它们的代孕妈妈则彻底无关,非常符合克隆动物的鉴定金标准。细心的科学家们记录下了这5只小猴子的出生日期,它们先后出生于7月12日、9月28日、10月3日、10月8日、10月12日。

### 中国科学家发现世界首例节律紊乱猴模型存在精神疾病

这次实验制造出了5只基因敲除的克隆猴,基因敲除也非常成功。敲除节律基因BMAL1的实验猴表现出了明显的节律紊乱、睡眠障碍与精神问题,与之前的动物实验与临床观察都能匹配上。

事实上,2015年底,神经所科研团队就曾经利用CRISPR/Cas9技术,针对核心节律基因BMAL1进行基因编辑,并在2016年年中顺利生出了五只敲除小猴。

等到半年后小猴断奶,研究人员就从多个方面开始观察敲除猴的生物节律。研究人员给猴子们佩戴了“小米手环”,可以随时监测到它们的昼夜活动情况,发现敲除猴并未按照24小时的周期活动,在夜间活动明显增多,这说明敲除猴可能出现了失眠的问题。于是研究人员通过手术,在猴子背部皮下埋入记录脑电和肌电的植入子,分析其睡眠周期,发现敲除猴的快速眼动睡眠和慢波睡眠明显减少。

有趣的一点是,Bmal1敲除小鼠的睡眠相比正常对照则是增多的,这也进一步提示了非人灵长类在脑疾病研究上的优势所在。在另一方面,研究人员通过搜集连续两天多个时间点的血液样本,对那些受节律调节的神经内分泌激素水平进行测定,发现帮助进入睡眠的褪黑素在敲除猴中分泌较少。同时还进行了血液分析,发现敲除猴的大多数节律基因表达异常,还有很多与睡眠剥夺、抑郁症以及衰老等相关的基因上调。

之所以如此大费周章构建基因敲除猴,研究者最期望的就是在这些猴身上找到节律紊乱者的精神症状,这些才是非人灵长类较之小鼠等实验动物的真正优势。

从本次的研究可以看到,猴子表现出怕人,避免与人对视等等精神问题,而这些症状是以前在小鼠身上很难探测到的。

有很多研究表明节律紊乱或睡

眠障碍还是一些精神疾病,如双相情感障碍、抑郁症、自闭症谱系障碍的早期症状。但是之前很难认定一只小鼠有抑郁或是双相情感障碍之类的问题,而这在灵长类身上就很明显了。研究人员在血液检测中发现与压力应激相关的皮质醇在敲除猴的血液中一直处于高水平,这让他们联想到敲除猴在与人接触时极度紧张的反应。当有人靠近敲除猴时,它会双手抱住头部,蜷缩在角落里,不敢活动。如果将敲除猴放入一个新环境中,它也不能很快地适应,不敢像正常猴那样在环境中自由探索。

此外,研究人员给猴子们做了一个经典的听觉刺激实验,在给出的一连串规律的声音中随机插入特殊的语音,记录猴子听到声音时的脑电,发现敲除猴大脑在识别和反应这些特殊事件的能力上不如正常猴,这与精神分裂患者的情况类似。

### [专家说法]

#### “失眠”猴帮助疾病治疗步入“精准时代”

业内专家认为,这次突破构建了世界首批生物钟紊乱实验用模型猴,填补了生物钟紊乱研究缺乏高等动物模型的空白。“这是一个理解人脑高级认知功能的新颖实验动物模型,对未来疾病治疗手段的研发很有用。”论文审稿人评价。

中科院神经科学研究所所长蒲慕明院士说,当下人类疾病治疗仍然过于“粗放”,未来,如果在科学实验和临床试验过程中再插入一个“新环节”,即将遗传背景一致、疾病表型明显的克隆猴作为新增验证手段,可以开发出更为“对症下药”的诊断治疗手段,人类疾病治疗的靶向和效果有望更加精准。

实验动物猴被大量用于人类疾病治疗手段研发和药物检测。多家机构统计结果显示,猴子用于生物医学研究的数量正逐年增加,全球年均使用量约10万只,主要用于药物安全性和代谢方面的测试研究。

中科院上海药物所所长蒋华良院士介绍,在克隆猴技术尚未突破前,由于野生猴的遗传背景各异、个体表征差异难统一,每次科学实验或药物检测都需使用大量实验猴做交叉验证,又由于野生猴繁殖周期长、单胎数量少,验证工作常常持续很多年。

“克隆猴实现短周期‘量产’后,实验动物用量有望大幅减少。”蒋华良说,新技术让人们在一年内就能制备出大批遗传背景相同的克隆猴,减少了个体差异对实验的干扰,以后只需使用很少数量的克隆猴就能完成药物的有效筛选。

对于公众高度关注的克隆、基因编辑等技术所涉及的伦理问题,蒲慕明强调,这项工作严格遵守国际伦理标准审查和认证,根本目的是为研究人类疾病发生机理和开发有效治疗手段服务。“有了克隆疾病猴的‘帮助’,药物研发可以在使用更少实验动物的前提下,缩短周期、提高成功率,促进生命科学和医学的发展。”蒲慕明说。

据新华社电