

· 综 述 ·

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在眼科疾病研究中的应用

范祥雨 综述 徐建江 审校

200031 上海,复旦大学附属上海眼耳鼻喉科医院眼科

通信作者:徐建江,Email:jianjiangxu@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.015

【摘要】 成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 (CRISPR associated proteins, Cas) 系统是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御系统,可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA。随着技术的不断进展,研究者发现 CRISPR/Cas9 技术可用于靶向插入、替换或敲除真核细胞基因。研究者运用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,发现了 PAX6 在角膜中的过度表达可导致先天性角膜上皮损伤,进一步加深了关于 KRT12 突变对 Meesmann 角膜上皮营养不良的致病机制的研究。研究还发现 PAX6 可通过对 GJA8 基因以及 α A 晶状体基因的敲除来进行先天性白内障动物模型的构建,有利于未来应用于先天性白内障的鉴别和病理分析。此外,研究者应用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术进一步证实了 RHOS334 基因突变的 RHO 等位基因、P23H 突变的 RHO 基因、Y347X 突变的 Pde6b 基因以及突变型 RP9 等位基因与视网膜色素变性的相关性,为突变型 KCNJ13 基因、突变型 CEP290 基因与 Leber 先天性黑矇的相关性提供了证据支持。利用该技术对 VEGFR2 基因以及 TXNIP 基因进行基因编辑可为眼内新生血管疾病提供新的治疗靶点,同时该技术在增生性玻璃体视网膜病变以及视网膜母细胞瘤的致病基因研究和动物模型构建中也发挥了重要的作用。本文对 CRISPR/Cas9 基因组编辑工具酶的发展历程、分子特点和作用机制进行总结,并概述了当前 CRISPR/Cas9 技术在眼科疾病研究中的进展及应用。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 基因编辑技术; 眼科疾病; 疾病动物模型; 基因疗法

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81670820、81670818); 上海市卫计委新优青计划项目 (2017YQ055); 上海市人才发展基金项目 (2017)

Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in the research of eye diseases Fan Xiangyu, Xu Jianjiang

Department of Eye & Visual Science, Eye, Ear, Nose & Throat Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China

Corresponding author: Xu Jianjiang, Email: jianjiangxu@126.com

【Abstract】 The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) is an adaptive immune system against invasive viruses and exogenous DNA, which is developed by bacteria and archaea during long-term evolution. With advances in technology, researchers have found that CRISPR/Cas9 system can precisely edit the genomes of eukaryotic cells through insertion, replacement or deletion of target genes. Using CRISPR/Cas9 genome editing technology, researchers found that overexpression of paired box gene 6 (PAX6) in cornea can cause congenital corneal epithelial damage; this technology promoted the research on the pathogenic mechanism of keratin 12 (KRT12) mutation in Meesmann corneal epithelial dystrophy; it has also built congenital cataract animal models by knocking out the GJA8 gene and α A lens gene, which is beneficial to the application of the diagnosis and pathological analysis of congenital cataract. In addition, the researchers have used CRISPR/Cas9 genome editing technology to confirm the correlation of RHOS334 mutated RHO allele, P23H mutated RHO gene, Y347X mutated Pde6b gene, and mutant RP9 allele with retinitis pigmentosa. The application of this technology has provided evidence to support the association of KCNJ13 gene and mutant CEP290 gene with Leber congenital amaurosis. CRISPR/Cas9 can provide target spot of intraocular neovascular diseases the targeted therapy by editing of VEGFR2 gene and TXNIP gene, and it also plays an important role in the study of pathogenic genes and establishment of animal models for proliferative vitreoretinopathy and retinoblastoma. In this review, we introduced the evolutionary history, the molecular characteristics and the mechanism of CRISPR/Cas9, and summarized its current

research advances in eye diseases.

[Key words] CRISPR/Cas9; Gene editing technology; Eye diseases; Animal disease models; Gene therapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670820, 81670818); Supported by Excellent Youth Medical Talents Training Program of Shanghai (2017YQ055); Shanghai Talent Development Funds (2017)

成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白系统 (CRISPR associated proteins, Cas) 广泛分布于细菌和古细菌基因组中,是在进化过程中形成的一种适应性免疫系统,可以降解入侵病毒或质粒 DNA^[1]。近年来,CRISPR/Cas 系统已发展成为包括眼科疾病在内的许多医学领域中的新型基因编辑工具,拥有精确的靶向功能,可通过靶向修饰来创建生物模型,并能以治疗为目的矫正疾病的突变^[2]。1987 年,CRISPR 被 Ishino 等^[3]报道为一组位于大肠杆菌中的 *iap* 基因下游的重复序列-间隔序列-重复序列的结构。之后,研究者们又在细菌和古细菌中,发现了 CRISPR 的间隔序列与噬菌体基因组和质粒高度同源,猜想 CRISPR 作为一种免疫系统可保护细菌和古细菌免受外源噬菌体、质粒或病毒的侵入^[4]。Barrangou 等^[5]通过将嗜热链球菌与不同的噬菌体共培养从而筛选具有噬菌体抗性的菌株,在 DNA 测序中发现了 CRISPR 座位中有了新的间隔序列,而此间隔序列正是来自侵染的噬菌体,并且证实了 CRISPR 和其相关的 *cas* 基因赋予了细菌对噬菌体的抗性。在自然界中,CRISPR/Cas 系统拥有多种类别,其中 CRISPR/Cas9 是研究最深入,应用最成熟的一种类别。CRISPR/Cas9 基因编辑技术是由细菌和古细菌中存在的 II 型 CRISPR/Cas 获得性免疫系统经人工改造而成,其介导的细菌获得性免疫具体机制的如下:当外源噬菌体或质粒进入细菌后,细菌通过识别特异的原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM),将外源 DNA 加工成大小合适的间隔序列,插入到 CRISPR 序列中。CRISPR 位点转录、表达 pre-crRNA,与重复序列区域转录而成的反式激活 RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 配对,在 Cns I 和 RNase III 作用下形成成熟的 crRNA,在 II 型 CRISPR/Cas 系统中, tracrRNA 和 crRNA 作为 2 种向导 RNA (guide RNA, gRNA) 或者融合在一起形成单向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA),可以与核酸内切酶 Cas9 结合,形成核糖核蛋白体复合物,引导 Cas9 蛋白特异性识别并结合到靶 DNA 序列上进行切割。Cas9 蛋白的核酸酶区域包含 HNH 核酸酶和 RuvC 样核酸酶结构域,分别切割互补和不互补的目标 DNA 链。Cas9 识别目标基因中的 PAM 序列, crRNA 识别位于 PAM 5' 端互补的 20 bp DNA 序列,继而稳定 Cas9 和基因组的结合,更易于靶位点的切割及基因组产生位点特异性双链断裂 (site-specific double-strand breaks, DSB)^[6],进而利用细胞内原有的 DNA 修复途径,如非同源末端连接 (nonhomologous end-joining, NHEJ)、同源定向修复 (Homology directed repair, HDR) 等,引入、替换或删除靶基因^[7],对 DNA 进行遗传学修饰。CRISPR/Cas9 基因编辑技术是继 ZFN 和 TALEN 技术之后迅速发展起来的第 3 代基因组编辑

技术。与 ZFN 和 TALEN 技术相比,该技术不仅在设计、合成与筛选上更为简便、快捷,而且可以在 1 个细胞内同时靶向定位多个基因位点进行编辑,成倍地提高了基因编辑的效率,且更适用于多基因编辑^[8]。由于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的制备简单、成本低廉、作用高效且无种属限制等特点,较 ZFN 和 TALEN 表现出明显的优势,故从诞生之日起,它就成为了众多科研工作者关注的宠儿并获得了快速发展。但是 Cas 蛋白的不稳定性和脱靶效应又在一定程度上限制了其应用的范围^[9]。

1 CRISPR/Cas9 系统在眼科疾病研究中的应用

随着技术的不断进展,从斑马鱼与哺乳动物眼睛的发育模型和疾病模型的修饰,到纠正患者干细胞中的致病突变,CRISPR/Cas9 系统已成功应用于视觉科学和眼科疾病的研究中。为了通过列举 CRISPR/Cas9 成功应用于眼科疾病的案例,来展示该技术在生物医药领域的发展现状,剖析该技术存在的问题,并对 CRISPR/Cas9 系统的应用前景进行展望,以期为人类疾病动物模型的创立以及基因治疗的发展提供新思路,因此本文将按照从眼前节到眼后节的眼部解剖顺序,对 CRISPR/Cas9 系统在眼部疾病中的应用和研究进展展开综述。

1.1 先天性角膜上皮损伤

角膜上皮损伤指由于各种因素导致的角膜上皮屏障功能与完整性受到破坏,引起角膜上皮细胞层部分或全层缺失的病理状态,临床上可表现为角膜上皮弥漫性点状脱落或糜烂,角膜上皮反复剥脱与缺损,并伴有不同程度的眼表炎性反应,严重者可导致角膜基质病变,影响视功能^[10]。引起角膜上皮损伤的致病因素可分为先天性和后天性,现讨论先天性角膜上皮损伤中 CRISPR 的应用。配对盒基因 6 (paired box gene 6, PAX6) 是高度保守的转录因子,可控制前脑、胰腺以及包括角膜上皮、虹膜、晶状体和视网膜在内的眼组织的发育。作为眼形成的必需转录因子, PAX6 改变可导致各种眼部畸形,先天性虹膜缺损就是其中一种研究得较深入的类型^[11]。Yasue 等^[12]进一步论证了 PAX6 在眼睛发育中的重要性,他们利用 CRISPR/Cas 系统构建了 PAX6 突变的小鼠胚胎模型,发现眼睛畸形程度取决于所产生的突变类型,最严重的畸形与 *null* PAX6 突变体有关。然而,此研究对于 PAX6 基因是如何调节人类角膜上皮细胞 (cornea epithelial cells, CECs) 的作用机制尚不清楚。Davis 等^[13]通过微阵列分析和定量 PCR,观察 PAX6 转基因型 (PAX6 Tg) 小鼠的角膜的基因表达变化,并与年龄匹配的野生型 (WT) 小鼠的角膜进行比较。结果发现 PAX6 在角膜中的过度表达导致角膜异常:包括上皮细胞数量和形态的改变,新生血管的形成,免疫细胞的浸润,屏障的受损以及角膜特

异性角蛋白 12(keratin 12, KRT12)的减少。这表明 *PAX6* 直接有助于正常角膜功能的维持。最近, Kitazawa 等^[14] 使用 CRISPR-Cas9 系统在体外敲除 CEC 中的 *PAX6* 基因。通过微阵列分析和定量 PCR 方法, 发现与对照组相比, 缺乏 *PAX6* 基因的人类 CEC 中角膜上皮特异性基因 (*KRT3*, *KRT12*) 下调, 表皮相关基因 (*KRT10*, *IVL*) 上调。研究者基于研究结果得出结论——*PAX6* 通过抑制表皮相关基因而调节与角膜正常分化相关的基因, 以保持 CEC 的细胞特性。这不仅进一步验证 CRISPR-Cas9 系统可应用于体外人类基因组的编辑, 也有助于进一步理解上皮细胞形成与维持的基因调控机制。

1.2 Meesmann 角膜上皮营养不良

Meesmann 角膜上皮营养不良 (Meesmann epithelial corneal dystrophy, MECD) 是角膜上皮罕见的常染色体显性遗传性疾病, 其特征在裂隙灯显微镜下角膜上皮双侧对称分布的细小点状混浊和囊肿。虽然疾病早期通常是无症状的, 囊肿在青春期后期和成年期的增生可引起上皮侵蚀, 导致流泪、畏光和疼痛^[15]。*KRT12* 基因突变是首次报道的 MECD 的致病因素^[16]。随着不断的探索, 研究者发现 *KRT3* 和 *KRT12* 基因分别编码 K3 和 K12, 而角膜特异性 K3-K12 角蛋白的存在对维持角膜上皮完整性至关重要, *KRT12* 中的 23 个突变和 *KRT3* 中的 3 个突变决定了 MECD 病变的严重性^[17], 但仍然对 *KRT12* 突变导致角膜微囊肿形成的确切机制不甚了解^[17]。近来, Courtney 等^[18] 发现在 MECD 的角膜中, 位于 *KRT12* 基因中的 *C395T* 致病突变体可以导致一种新的 PAM 出现, 研究者从而设计了 sgRNA, 与这种单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 来源的 PAM 的相邻序列互补, 并在体外实验证明这种 sgRNA 可以有效降低 *KRT12* 突变基因 mRNA 和蛋白水平的表达。为了评估 sgRNA 的体内活性, 将融合了 Cas9/sgRNA 的质粒注射入携带人类 MECD 基因突变的小鼠角膜基质中。通过基因组测序分析显示 NHEJ 修复可以导致 *KRT12* 突变等位基因内的移码缺失。这项研究在进一步加深了对 *KRT12* 突变的致病机制的研究的同时, 也显示了 CRISPR/Cas9 对常染色体显性遗传病进行基因治疗的潜力。

1.3 先天性白内障

先天性白内障是儿童常见的致盲性眼病, 其致病因素包括遗传因素和环境因素等。近 1/3 的先天性白内障为单基因遗传病, 临床表现为单纯眼部异常或作为相关综合征的表型之一, 具有显著的临床和遗传异质性^[19]。Chang 等^[20] 构建了 *GJA8* 基因位点突变的小鼠模型, 发现其 $\alpha 3$ 连接蛋白的改变。这些小鼠模型有助于理解缝隙连接损伤和白内障形成之间的机制关系。之后的研究进一步表明, 编码缝隙连接蛋白 (connexin, Cx) 50 的 *GJA8* 基因与常染色体显性遗传性先天性白内障有关^[21]。Yuan 等^[22] 通过将 Cas9/sgRNA mRNA 共同注射到兔的受精卵中, 构建了具有 *GJA8* 基因敲除的兔白内障模型。结果表明, *GJA8* 基因座的基因突变效率在胚胎中达到 98.7%, 在幼崽中达 100%。此研究不仅进一步印证了 *GJA8* 基因的敲除与人类先天性白内障的关系, 也提示了 Cas9/sgRNA 系统可作为兔子基因组编辑的高效工具。同时, 这种新型兔白

内障模型将为用于预防和治疗白内障的新药的筛选提供方便。 α 晶状体蛋白是维持晶状体正常功能所必需的小分子热激蛋白。对斑马鱼和金盲眼灯鱼的研究表明, 单独减少 α A 晶状蛋白可以抑制正常的纤维细胞分化, 促使晶状体变性并引起白内障^[23]。最近, Yuan 等^[24] 通过将 Cas9/sgRNA mRNA 共注射到兔的受精卵中, 构建了具有 α A 晶状体基因敲除先天性白内障兔模型。在对具有 α A 晶状体蛋白基因突变的 19 个 F0 代和 11 个 F1 代兔的重复观察中研究白内障表型。数据表明, CRISPR/Cas9 介导的兔 α A 晶状蛋白基因的突变表现出先天性白内障、小眼炎、晶状体早期萎缩的表型, 以及晶状体纤维细胞正常分化的抑制。这些研究结果有助于构建一种新型动物模型, 未来可用于先天性白内障的鉴别和病理分析的研究中。

1.4 视网膜色素变性

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是遗传性视网膜变性的常见形式, 是一类因基因突变而导致进行性光感受器及视网膜色素上皮细胞损伤的视网膜遗传性疾病^[25]。眼底表现以骨细胞样色素沉着、视网膜血管变细、视盘萎缩为典型特征^[26]。临床表现为夜视力损伤和视野缺损, 严重者致盲。RP 的遗传方式约 30% ~ 40% 为常染色体显性遗传, 50% ~ 60% 为常染色体隐性遗传, 5% ~ 15% 为 X 连锁遗传^[27]。到目前为止, 研究者已鉴定了 24 个常染色体显性遗传 RP 致病基因及 1 个连锁区域 (RP63), 其中视紫红质基因 (rhodopsin, *RHO*) 约占常染色体显性遗传 RP 病例的 30% ~ 40%^[28]。据人类基因突变数据库 (The Human Gene Mutation Database, HGMD) 统计, *RHO* 基因突变有 161 种, 其中第一个被发现的 *RHO* 基因突变是 *P23H*, 在美国 ADRP 患者中占 12%, 是一个高发突变。Bakondi 等^[29] 构建了携带 *RHO*S334 点突变的常染色体显性遗传性 RP 大鼠模型, 通过单次注射和电穿孔, 将 Cas9/sgRNA 质粒递送至大鼠视网膜下, 进而将携带显性 *RHO*S334 突变的 *RHO* 等位基因敲除。结果显示敲除了突变基因的大鼠, 视网膜变性程度有所缓解, 光敏度和视敏度有所提高。类似于 Bakondi 等人的工作, Latella 等^[30] 使用 CRISPR/Cas9 系统, 对转基因小鼠模型中的携带 *P23H* 突变的 *RHO* 基因进行编辑。在视网膜下注射 Cas9/sgRNA 质粒后, 进行电穿孔, 结果证明了在转基因小鼠模型中敲除 *P23H* 突变的 *RHO* 基因的可行性。这也进一步证实了 CRISPR/Cas9 系统可对常染色体显性遗传病进行基因治疗的潜力。Wu 等^[31] 使用 CRISPR-Cas9 系统来校正 RP 模型小鼠的 *Pde6b* 基因中的 *Y347X* 突变。这些小鼠在 *Pde6b* 中还含有病毒介导的 *Xmv-28* 插入, 需要探究 *Xmv-28* 插入或 *Y347X* 突变, 二者何为 RP 表型的主要原因。使用 CRISPR-Cas9 系统纠正了 *Y347X* 突变后, 结果显示视网膜的结构和功能明显改善, 这也侧面说明了 *Xmv-28* 插入并非致病因素。Lv 等^[32] 利用 CRISPR-Cas9 系统, 体外敲除小鼠视网膜感光细胞系中 *RP9* 基因并敲入 RP 特异性 *RP9* 突变体, 结果导致视网膜感光细胞的增生和迁移受到破坏。因此认为突变型 *RP9* 等位基因与常染色体显性遗传 RP 相关。这项研究也显示出 CRISPR/Cas9 在哺乳动物细胞体外实验中的应用对于人类遗传性疾病研究的意义。

1.5 Leber 先天性黑矇

Leber 先天性黑矇 (Leber congenital amaurosis, LCA) 是一种严重的先天性致盲性视网膜营养不良,也是发病最早、最严重的遗传性视网膜病变,约占遗传性视网膜变性疾病的 5%,具有遗传异质性与表型多样性的特点^[33]。人类 *KCNJ13* 的突变被认为是引起 LCA 的早发型盲的致病因素之一。为验证这一理论,Zhong 等^[34]运用 CRISPR/Cas9 系统,向受精卵中注射设计好的 Cas9/sgRNA 质粒,产生 *KCNJ13* 基因突变的小鼠,模拟与 *KCNJ13* 突变相关的人类 LCA 疾病。结果发现 *KCNJ13* 基因的嵌合体表达,与光感受器细胞退化以及对光的敏感度降低相关,缺乏 *KCNJ13* 蛋白的 RPE 细胞虽然仍旧存活,但覆盖于其上的光感受器细胞出现细胞变性。研究表明,RPE 细胞需要 *KCNJ13* 基因的表达来维持光感受器的存活。LCA10 作为 LCA 的最常见亚型,是由 *CEP290* 基因突变引起的严重的先天性视网膜营养不良,LCA10 患者中最常见突变是 *CEP290* 基因的内含子突变。Ruan 等^[35]将 *CEP290* 剪接突变体引入 293FT 细胞中,产生 LCA10 的细胞模型,研究表明运用 Cas9/gRNA 腺相关病毒可以高效地敲除 *CEP290* 基因的内含子剪接突变体并恢复野生型 *CEP290* 表达。这些结果提供的证据支持有利于进一步的研究开展,以验证基于 CRISPR/Cas9 的基因治疗策略对于治疗 LCA10 患者的潜力。

1.6 眼内新生血管疾病

眼内新生血管形成是增生型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR)、年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、新生儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 等多种与视网膜、脉络膜血液循环相关的眼科疾病共有的病理改变^[36-37]。新生血管内皮细胞间隙增大引起渗出、出血、增生可严重破坏眼的结构和功能,导致患者不同程度的视力障碍。新生血管的形成是多种细胞因子参与并相互作用的一个复杂过程,大量的研究表明新生血管形成与血管生长因子和血管生长抑制因子之间的失衡有关。目前发现至少有 20 多种生长因子作用于血管内皮细胞,其中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是眼内新生血管生成最重要的细胞因子^[38]。AMD 是发达国家老年人口失明的主要原因。脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是湿性年龄相关性黄斑病变的特征性病理改变,主要由 VEGFA 过度表达引起^[39]。在 CNV 小鼠模型中, Kim 等^[40]通过视网膜下注射经由腺相关病毒载体递送的 *VEGFA* 基因特异性 Cas9/sgRNA 复合物来诱导靶向突变,发现 RPE 细胞在注射后 3 d 中的突变频率为 (25±3)%。研究结果显示 RPE 细胞中的 *VEGFA* 基因突变减少了激光诱导的脉络膜新生血管形成的面积。该研究表明 CRISPR/Cas9 技术介导的体内基因组编辑是治疗年龄相关性黄斑变性的新选择,这也将基因治疗的应用范围扩展到新的维度。众所周知,VEGFA 已经成为眼部新生血管抑制剂的常用靶点,另一个潜在的靶点是 VEGFA 受体 (VEGFR2)。Huang 等^[41]运用 CRISPR/Cas9 技术,对人类视网膜微血管内皮细胞中 *VEGFR2* 基因外显子 3 (exon 3) 进行基因编辑。结果发现 *VEGFR2* 基因突变显著降低

了由 VEGF 刺激所引起的血管内皮细胞增生,突变型 *VEGFR2* 细胞群对 VEGF 的反应性被抑制,受抑制程度超过经阿柏西普和兰尼单抗处理后的细胞。研究证明了运用 CRISPR/Cas9 系统,可对血管内皮细胞的生长因子受体进行基因编辑,这也为眼内新生血管疾病提供了新的治疗靶点。硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 是由糖尿病和高葡萄糖状态强烈诱导的促氧化应激,促炎症和促凋亡蛋白,参与了增生性糖尿病视网膜病变的疾病演变过程^[42-43]。TXNIP 对于通过线粒体自噬去除受损线粒体这个宏观自噬过程的作用机制,仍有待探索。为了研究糖尿病状态下视网膜细胞中线粒体的相关细胞和分子机制,Devi 等^[44]把大鼠 Müller 细胞系 (rMC1) 在高葡萄糖 (25 mmol/L) 或低葡萄糖 (5.5 mmol/L) 条件下进行为期 5 天的体外培养。数据显示,高糖可在细胞溶质以及线粒体中上调 TXNIP 的表达,引起线粒体超氧化物产生和线粒体功能障碍。相反,运用 Cas9/gRNA 进行 *TXNIP* 基因的敲除可以有效防止高糖诱导的线粒体损伤和 rMC1 中的线粒体自噬。研究结果证明了 *TXNIP* 基因在糖尿病患者视网膜 Müller 细胞的线粒体中的关键作用。此外,本研究中使用 Cas9/gRNA 以敲除 *TXNIP* 基因的案例,也为糖尿病视网膜病变以及糖尿病的其他微血管并发症提供了潜在的治疗策略。

1.7 增生性玻璃体视网膜病变

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是一种常见的致盲眼病,表现为受损的玻璃体及视网膜的异常修复。PVR 常发生于眼外伤、孔源性视网膜脱离或眼内手术后。在血-视网膜屏障受损后的损伤修复过程中,视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE)、神经胶质细胞、成纤维细胞等发生增生、迁移,形成增生膜附着于视网膜。视网膜表面上的瘢痕状纤维细胞膜收缩,引起牵引视网膜 (再) 脱离并最终导致永久性的视力丧失^[45]。RPE 发生上皮-间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 到形成肌成纤维细胞表型,随后在视网膜表面进行附着、扩散、增生和迁移,是 PVR 发病机制的关键事件^[46]。在对 EMT 的研究中,Priglinger 等^[47]分别应用 SpCas9 和 siRNA,敲除和敲低 RPE 中的 $\beta 1$, 6N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 V (MGAT5) 基因。研究者发现体外实验中 RPE 中 MGAT5 基因表达的下调导致半乳糖凝集素-3 蛋白与表面聚糖的结合力降低,证实了 MGAT5 与 EMT 的联系,并实现半乳糖凝集素-3 蛋白成为 PVR 未来潜在的治疗靶点提供了理论依据。

1.8 视网膜母细胞瘤

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是儿童时期最为常见的眼内恶性肿瘤。该肿瘤发病较早,进展较快,致死率和致死率较高。视网膜母细胞瘤是由于 *RBI* 基因在生殖细胞或体细胞上发生双等位基因突变所致^[48]。尽管近些年来视网膜母细胞瘤的治愈率有所增加,但由于当前的技术无法高效地构建视网膜母细胞瘤的动物模型,迄今为止分子靶向治疗技术仍未应用于该疾病之中。Naert 等^[49]通过 CRISPR/Cas9 技术使得非洲爪蟾的 *Rb1* 和 *Rb1l* 基因失活,发现 *Rb1* 或 *Rb1l* 单嵌合突变体非洲爪蟾不会发生肿瘤,而 *Rb1/Rb1l* 双嵌合突变体非洲爪

蟾蝌蚪可迅速发展为视网膜母细胞瘤。此次研究提供了第一个 CRISPR/Cas9 介导的非洲爪蟾癌症模型以及第一个遗传性非哺乳动物视网膜母细胞瘤模型。利用 Cas9/gRNA 注射构建的该种动物模型有助于快速鉴定可供治疗性干预和新药研究开发的靶标。

2 结语

虽然 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的诞生时间晚,但是它的发展却非常迅速。作为最具有基础研究和临床应用前景的基因治疗技术之一,CRISPR/Cas9 已成为基因组编辑领域的研究热点,并为人类眼科疾病的研究和治疗带来希望。一方面研究者可应用 CRISPR/Cas9 技术靶向插入、替换或敲除治病基因,构建疾病的动物模型从而深入研究眼科疾病的发病机制;另一方面,CRISPR/Cas9 技术对患者的基因组进行靶向编辑的能力也进一步证明了其作为一种眼科疾病治疗策略的潜力。尽管目前 CRISPR/Cas9 系统仍然面临许多难题,但其制备简单、操作便捷、作用高效且无种属限制等特点,是传统基因修饰技术甚至第 2 代基因修饰技术所不具备的。如何进一步提升 CRISPR/Cas9 系统中的 Cas 蛋白的稳定性和靶点结合的特异性以及如何进一步的优化基因编辑效率,将成为今后基因编辑技术领域中的研究方向之一。展望未来,我们有理由相信,随着技术的不断突破,CRISPR/Cas9 系统将会在包括眼科学在内的医学的更多领域中得到广泛的应用,并对人类生活产生深远的影响。

参考文献

- [1] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. *Nature*, 2012, 482 (7385): 331–338. DOI:10.1038/nature10886.
- [2] DiCarlo JE, Sengillo JD, Justus S, et al. CRISPR-Cas Genome Surgery in Ophthalmology[J/OL]. *Transl Vis Sci Technol*, 2017, 6(3): 13 [2017-10-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28573077>. DOI: 10.1167/tvst.6.3.13.
- [3] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. 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.
- [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. DOI:10.1126/science.1225829.
- [5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712. DOI:10.1126/science.1138140.
- [6] Nafissi N, Foldvari M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools [J/OL]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 355 [2017-10-21]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00355/full>. DOI:10.3389/fnins.2015.00355.
- [7] Osakabe Y, Osakabe K. Genome editing with engineered nucleases in plants[J]. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(3): 389–400. DOI:10.1093/pcp/pcu170.
- [8] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918. DOI:10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [9] Liu B, Xu H, Miao J, et al. CRISPR/Cas: A Faster and More Efficient Gene Editing System[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2015, 15(3): 1946–1959.
- [10] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 我国角膜上皮损伤临床诊治专家共识(2016 年) [J]. *中华眼科杂志*, 2016, 52(9): 644–648. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2016.09.002.
- [11] Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, et al. Positional cloning and characterization of a paired box-and homeobox-containing gene from the aniridia region[J]. *Cell*, 1991, 67(6): 1059–1074.
- [12] Yasue A, Kono H, Habuta M, et al. Relationship between somatic mosaicism of PAX6 mutation and variable developmental eye abnormalities-an analysis of CRISPR genome-edited mouse embryos [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 53. DOI:10.1038/s41598-017-00088-w.
- [13] Davis J, Piatigorsky J. Overexpression of PAX6 in mouse cornea directly alters corneal epithelial cells: changes in immune function, vascularization, and differentiation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(7): 4158–4168. DOI:10.1167/iovs.10-6726.
- [14] Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, et al. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity[J]. *Exp Eye Res*, 2017, 154: 30–38. DOI:10.1016/j.exer.2016.11.005.
- [15] Hassan H, Thauang C, Ebenezer ND, et al. Severe Meesmann's epithelial corneal dystrophy phenotype due to a missense mutation in the helix-initiation motif of keratin 12[J]. *Eye (Lond)*, 2013, 27(3): 367–373. DOI:10.1038/eye.2012.261.
- [16] Sullivan LS, Baylin EB, Font R, et al. A novel mutation of the Keratin 12 gene responsible for a severe phenotype of Meesmann's corneal dystrophy[J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 975–980.
- [17] McLean WH, Moore CB. Keratin disorders: from gene to therapy[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(2): 189–197. DOI:10.1093/hmg/ddr379.
- [18] Courtney DG, Moore JE, Atkinson SD, et al. CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both *in vitro* and *in vivo* KRT12 mutation-specific targeting[J]. *Gene Ther*, 2016, 23(1): 108–112. DOI:10.1038/gt.2015.82.
- [19] Reddy MA, Francis PJ, Berry V, et al. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes [J]. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49(3): 300–315. DOI:10.1016/j.survophthal.2004.02.013.
- [20] Chang B, Wang X, Hawes NL, et al. A Gja8 (Cx50) point mutation causes an alteration of alpha 3 connexin (Cx46) in semi-dominant cataracts of Lop10 mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(5): 507–513.
- [21] Zhu Y, Yu H, Wang W, et al. Correction: a novel GJA8 mutation (p. V44A) causing autosomal dominant congenital cataract [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125949 [2017-10-21]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125949>. DOI: 10.1371/journal.pone.0125949.
- [22] Yuan L, Sui T, Chen M, et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22024. DOI:10.1038/srep22024.
- [23] Goishi K, Shimizu A, Najjar G, et al. AlphaA-crystallin expression prevents gamma-crystallin insolubility and cataract formation in the zebrafish cloche mutant lens [J]. *Development*, 2006, 133(13): 2585–2593. DOI:10.1242/dev.02424.
- [24] Yuan L, Yao H, Xu Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of α A-crystallin gene induces congenital cataracts in rabbits [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(6): 34–41. DOI:10.1167/iovs.16-21287.
- [25] Rossmiller B, Mao H, Lewin AS. Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 2479–2496.
- [26] Athanasiou D, Aguila M, Bevilacqua D, et al. The cell stress machinery and retinal degeneration[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(13): 2008–2017. DOI:10.1016/j.febslet.2013.05.020.
- [27] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa [J]. *Lancet*, 2006, 368(9549): 1795–1809. DOI:10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- [28] Ferrari S, Di IE, Barbaro V, et al. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms[J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(4): 238–249. DOI: 10.2174/138920211795860107.
- [29] Bakondi B, Lyu W, Lu B, 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. DOI:10.1038/mt.2015.220.
- [30] Latella MC, Di SMT, Cocchiarella F, et al. *In vivo* editing of the human mutant rhodopsin gene by electroporation of plasmid-based CRISPR/Cas9 in the mouse retina [J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016,

- 5(11): e389 [2017-10-21]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1366-3027\(17\)30272-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1366-3027(17)30272-8). DOI:10.1038/mtna.2016.92.
- [31] Wu WH, Tsai YT, Justus S, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa: a brief methodology [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1715: 191-205. DOI:10.1007/978-1-4939-7522-8_13.
- [32] Lv JN, Zhou GH, Chen X, et al. Targeted RP9 ablation and mutagenesis in mouse photoreceptor cells by CRISPR-Cas9 [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43062 [2017-10-21]. <https://www.nature.com/articles/srep43062>. DOI:10.1038/srep43062.
- [33] den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, et al. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(4): 391-419. DOI:10.1016/j.preteyeres.2008.05.003.
- [34] Zhong H, Chen Y, Li Y, et al. CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of Kcnj13 function in mice mimics human disease phenotypes [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8366 [2017-10-21]. <https://www.nature.com/articles/srep08366>. DOI:10.1038/srep08366.
- [35] Ruan GX, Barry E, Yu D, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing as a therapeutic approach for Leber congenital amaurosis 10 [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2): 331-341. DOI:10.1016/j.ymthe.2016.12.006.
- [36] Dreyfuss JL, Giordano RJ, Regatieri CV. Ocular angiogenesis [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2015, 2015: 892043 [2017-10-21]. <https://www.hindawi.com/journals/joph/2015/892043/>. DOI:10.1155/2015/892043.
- [37] Bressler SB. Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmology*, 2009, 116(10 Suppl): S1-7. DOI:10.1016/j.ophtha.2009.06.045.
- [38] Ferrara N, Davissmyth T. The biology of vascular endothelial growth factor [J]. *Endocrine Rev*, 1997, 18(1): 4-25. DOI:10.1210/er.18.1.4.
- [39] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. *Science*, 1989, 246(4935): 1306-1309.
- [40] Kim K, Park SW, Kim JH, et al. Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration [J]. *Genome Res*, 2017, 27(3): 419-426. DOI:10.1101/gr.219089.116.
- [41] Huang X, Zhou G, Wu W, et al. Genome editing abrogates angiogenesis *in vivo* [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 112 [2017-10-21]. <https://www.nature.com/articles/srep35264>. DOI:10.1038/srep35264.
- [42] Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, et al. Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: implications for diabetic retinopathy [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(7): 1001-1012. DOI:10.1016/j.yexcr.2013.01.012.
- [43] Perrone L, Devi TS, Hosoya KI, et al. Inhibition of TXNIP expression *in vivo* blocks early pathologies of diabetic retinopathy [J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1: e65. DOI:10.1038/cddis.2010.42.
- [44] Devi TS, Somayajulu M, Kowluru RA, et al. TXNIP regulates mitophagy in retinal Müller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2777 [2017-10-21]. <https://www.nature.com/articles/cddis2017190>. DOI:10.1038/cddis.2017.190.
- [45] Craiu AM. Proliferative retinopathy, friend or foe? [J]. *Ophthalmologia*, 2009, 53(3): 64-72.
- [46] Machemer R. Proliferative vitreoretinopathy (PVR): a personal account of its pathogenesis and treatment. Proctor lecture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988, 29(12): 1771-1783.
- [47] Priglinger CS, Obermann J, Szober CM, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of RPE cells *in vitro* confers increased β 1,6-N-Glycosylation and increased susceptibility to Galectin-3 binding [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146887 [2017-10-21]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146887>. DOI:10.1371/journal.pone.0146887.
- [48] Horsthemke B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 63(1): 1-7.
- [49] Naert T, Colpaert R, Van Nieuwenhuysen T, et al. CRISPR/Cas9 mediated knockout of *rb1* and *rb1l* leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in *Xenopus tropicalis* [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35264 [2017-10-21]. <https://www.nature.com/articles/srep35264>. DOI:10.1038/srep35264.

(收稿日期:2017-12-21 修回日期:2018-06-03)

(本文编辑:杜娟)

读者·作者·编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省眼科研究所 河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药物学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)