

DOI: 10.12287/j.issn.2096-8965.20210210

利用CRISPR/Cas9基因编辑靶向下调FGFR2缓解Apert综合征小鼠颅缝早闭

罗凤涛, 谢杨丽, 李灿, 谭乔燕, 杜晓兰, 陈林*

(第三军医大学大坪医院, 战伤组织修复与康复医学研究室, 重庆 400042;
第三军医大学创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

【摘要】 Apert综合征 (Apert Syndrome, AS) 是一类常染色体显性遗传疾病, 主要表现为颅缝早闭、中面部发育不良、并指 (趾)、智力发育障碍等, 多由FGFR2分子功能增强型点突变引起。目前, 此疾病主要靠手术矫形来恢复功能, 其中大脑等病变部位手术难度大, 难以实施, 且通常需要多次手术。CRISPR/Cas9基因编辑技术在人类遗传病治疗中具有巨大潜力。本研究筛选到靶向FGFR2基因的gRNA, 与Cas9经慢病毒包装后作用于Apert小鼠 (FGFR2^{+P253R}) 的原代颅骨细胞、体外培养的颅骨以及活体小鼠颅骨中, 可敲低FGFR2的表达, 改善Apert原代颅骨细胞的分化程度。CRISPR/Cas9处理体外培养的颅骨及注射至Apert小鼠头颅, 颅骨冠状缝早闭状态有效缓解, 异常降低的颅骨骨量、骨密度等也显著改善, 表明CRISPR/Cas9基因编辑可缓解Apert小鼠头颅异常。本研究为Apert综合征的基因治疗提供了实验依据, 有望为其它骨骼遗传病治疗提供新的策略与借鉴。

【关键词】 颅缝早闭; Apert综合征; 2型成纤维细胞生长因子受体; CRISPR/Cas9基因编辑

中图分类号: R459.9, Q789 文献标识码: A 文章编号: 2096-8965(2021)02-0063-09

CRISPR/Cas9 mediated FGFR2 down-regulation alleviates premature closure of cranial suture in an Apert syndrome mouse model

Luo Fengtao, Xie Yangli, Li Can, Tan Qiaoyan, Du Xiaolan, Chen Lin*

(Department of Wound Repair and Rehabilitation, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;
State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Apert syndrome (AS) is characterized by synostosis of coronal sutures, midfacial hypoplasia, abnormality of brain, syndactyly of hands and feet. Majority of AS is caused by gain-of-function mutation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2). To date, the treatment of AS is surgical correction for the deformed skull. The reconstruction of sutures is often executed several times, because of constant premature of sutures. Some diseased tissues, such as brain, are difficult to treat with surgery. CRISPR/Cas9 gene editing technology exhibits powerful prospect in the treatment of human genetic diseases. In this study, small guiding RNA (gRNA) specifically targeting the Fgfr2 gene was screened and lentivirus mediated Cas9/gRNA was employed to treat mice (Fgfr2^{+P253R}) that mimicking human Apert syndrome in primary calvarial cells, calvarial explants or calvarial bone. In cultured primary calvarial cells, Cas9/gRNA reduced the phosphorylation of ERK1/2 and P38, and resultantly inhibit-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81672125); 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxmX0112; cstc2018jcyjAX0704)

通讯作者: 陈林 (1965-), 男, 重庆梁平人, 博士生导师, 主要从事利用基因工程小鼠、斑马鱼等模型及临床资源, 研究FGF等信号在骨骼发育、遗传及退行性骨病中的作用与机制、康复物理因子生物效应及机制等。E-mail: Linchen70@163.com

ed osteoblastic differentiation and matrix mineralization. Besides, Cas9/gRNA attenuated the premature closure of coronal suture and the decreased calvarial bone volume calvarial explants and AS mice. This study provides experimental basis of gene therapy for Apert syndrome, and is prospective to provide new strategies for the treatment of skeletal genetic diseases.

【Keywords】Craniosynostosis; Apert syndrome; FGFR2; CRISPR/Cas9 gene editing

前言

颅缝早闭 (Craniosynostosis, CS) 是一类由一个或多个颅缝提前闭合为主要表现的疾病^[1]。CS新生儿发生率约为 1/1 400^[2], 按发生早闭的颅缝不同和伴随的体征等, 可有多种类型的颅缝早闭综合征, 包括 Apert、Pfeiffer、Crouzon、Jackson-weiss 综合征等^[3]。Apert 综合征 (OMIM: 101200) 是临床上最严重的 CS, 主要由于冠状缝早闭、颅底软骨连接提前融合, 患者表现出短头畸形, 严重颜面发育不良, 伴有大脑形态异常和智力发育障碍。Apert 综合征主要由 2 型成纤维细胞生长因子受体 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2, FGFR2) 的 Ser252Trp (S252W) 或 pro253Arg (P253R) 功能增强型 (Gain-of-function) 点突变引起^[4]。FGFR2 是成纤维细胞生长因子受体 (Fibroblast Growth Factor Receptor, FGFR) 成员, 当其胞外段与 FGF 信号分子结合, 发生受体同源二聚化作用, 激活胞内段的酪氨酸激酶活性, 通过 Ras-MAPK、PLC- γ 及 PI3K/AKT 等实现下游信号传导, 在细胞增殖、分化、迁徙等过程中发挥重要作用^[5]。近年研究表明, 在 Apert 颅缝中, FGFR2 突变上调下游丝裂原活化蛋白激酶 1、2 (ERK1/2)、P38 等磷酸化水平, 引起细胞增殖、分化异常, 导致颅缝早闭^[6, 7]。

Apert 综合征头颅畸形的治疗主要可通过颅缝再造术、颅骨成形术等获得新颅缝, 降低颅内压, 改善头颅畸形^[8]。但是, 由于 FGFR2 突变持续表达, 手术再造的颅缝有再次早闭的风险, 导致有部分病人需要多次手术, 其它受影响的组织 (如大脑等), 难以手术治疗^[9]。开发治疗 Apert 综合征的药物, 作为辅助手术的治疗方式, 具有重要意义。本实验室和美国 Ethylin Wang Jabs 教授等分别建立了模拟人 Apert 综合征的 FGFR2 两个点突变小鼠模型 (FGFR2^{+S252W}; FGFR2^{+P253R}), 可较好地模拟该疾病, 为相关药物开发提供了基础^[6, 7, 10, 11]。

随着颅缝早闭细胞分子机制的进一步阐明和分子表达运载系统的迅速发展, 分子治疗药物在颅缝早闭治疗中展现出较好前景。邓初夏课题组用

ERK1/2 抑制剂 U0126 注射部分抑制 Apert 小鼠中颅缝早闭^[12]。Yokota 等明确可溶性 FGFR2 突变胞外段蛋白可抑制 Apert 颅骨成骨细胞分化^[13]。本实验室 Xu 等发现用 Wnt/ β -catenin 信号抑制剂处理后减缓 Apert 小鼠股骨中小梁骨异常增加^[14]。但是, FGFR2 分子抑制剂、中和抗体等特异性不好, 可能会引起其它不良效果。

近年迅速发展的 CRISPR/Cas9 [Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) /CRISPR Associated Endonuclease 9 (Cas9)] 基因编辑技术在单基因遗传病治疗中表现出强大潜力^[15]。CRISPR/Cas9 已成功用于 β 地中海贫血 (β -thalassemia)^[16]、杜氏肌营养不良 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)^[17]、先天性黑蒙^[18]、血友病^[19]等的基因治疗。Apert 综合征作为单基因突变导致的遗传病, CRISPR/Cas9 基因编辑技术能否对其发挥治疗作用尚不清楚。本研究用慢病毒携带 CRISPR/Cas9 和靶向 FGFR2 基因的 gRNA 表达于 Apert 小鼠的颅骨, 并观察小鼠颅缝闭合及颅骨形态变化。结果显示, CRISPR/Cas9 注射后 Apert 小鼠冠状缝早闭状态有显著改善, 同时异常降低的颅骨骨量、骨密度等也显著升高, 表明 CRISPR/Cas9 基因编辑可缓解 Apert 小鼠头颅的异常状态。本研究为 Apert 综合征的基因治疗提供了实验依据, 有望为其它骨骼遗传病的临床治疗提供新的策略。

1 方法

1.1 小鼠的繁殖与基因型鉴定

Apert 模型小鼠 FGFR2^{+P253R} 由雌性 FGFR2^{+P253R-neo} 小鼠与 EIIa-Cre 小鼠交配繁殖得到。FGFR2^{+P253R-neo} 小鼠由本实验室制备及保存, EIIa-Cre 小鼠购于 Jax Lab。所有小鼠均在 SPF 动物房饲养 (第三军医大学大坪医院实验动物中心), 实验动物的使用遵循第三军医大学动物管理及伦理委员会的规定 (实验动物使用许可证号为: SYXK (PLA) 20120031)。FGFR2^{+P253R-neo} 小鼠基因型鉴定上下游引物为 R2-7R2: 5' -TTGATCCACTGGATGTGG-GGC-3', RINA: 5' -CCAGACTGCCTT-

GGGAA-AAGC-3' (neo 基因上)。EIIa-Cre小鼠基因型鉴定上下游引物为, C1: 5' -GCCTGCAT-TACCGGTCGATGC-3', C2: 5' -CAGGGTGTATA-AGCAAT-CCC-3'。重组小鼠鉴定引物为 R2-7R2 (同前), R2I6F1: 5' -TAGGTAGTCCATAACTC-GG-3'。PCR方法参见文献^[20], 按常规进行。

1.2 小鼠颅骨细胞、颅盖骨体外分离培养

出生后5 d小鼠处死, 于75%酒精中消毒5 min, 取出小鼠去头皮, 暴露颅骨, 小心剪下颅盖骨, 于PBS中漂洗2次。0.25%胰酶37℃培养箱中消化20 min, 用显微镊去除硬脑膜、骨膜与其它软组织, PBS清洗2次。保留颅缝组织(1~2 mm宽度), 剪碎于0.1%的I型胶原酶中消化6 h。将消化得到的颅骨细胞接种于 α -MEM+10%FBS+青链霉素双抗的培养液(Gibco)中, 于37℃的培养箱培养, 每2~3 d换液一次。待细胞融合度达到60%~80%时, 培养基中添加0.8 M地塞米松+0.01 M β -甘油磷酸钠+50 μ g/mL维生素C进行成骨诱导培养。诱导7 d的细胞用定量PCR检测成骨相关标记基因表达变化。诱导7 d、14 d的颅骨细胞, 进行矿化结节茜素红和ALP (Alkaline Phosphatase) 染色, 茜素红和ALP染色(Sigma-Aldrich)按常规方法进行。颅盖骨体外培养方法为, 取7~10 d龄小鼠, 按前述方法取下的颅盖骨, 不消化, 沿矢状缝剪开成左右两半, 分别置于金属网上于BGJb +10%FBS+青链霉素双抗的培养液(Gibco)中培养。

1.3 gRNA设计、慢病毒包装及使用

根据小鼠Fgfr2序列, 在线设计软件(<http://www.rgenome.net/cas-designer/>)进行gRNA设计及脱靶位点预测。序列为, gRNA1: ACCTACCACC-TGCATGTCGT; gRNA2: GATTCCCCCAGCCGGA-CAG; gRNA3: CTTCCATATCTCCACGTGGA。Cas9-Fgfr2-gRNA慢病毒由上海吉凯基因公司包装完成。处理颅骨细胞或体外培养的颅骨时, 慢病毒载体含EGFP, 使用按说明书在培养液中添加。新生Apert及同窝WT小鼠, 于d 0、d 4两次注射慢病毒, 采用颅骨皮下注射, 病毒浓度为 5×10^8 vg/mL, 每只小鼠注射10 μ L。所有病毒实验以不含Fgfr2-gRNA的Cas9慢病毒为对照(Ctrl)。

1.4 小鼠颅骨 MicroCT 扫描及三维重建

Cas9-Fgfr2-gRNA慢病毒处理(d 14)及注射的小鼠(d 30)颅骨, 4%PFA固定24 h, 进行microCT扫描(SCANCO公司, vivaCT40, 瑞士)。d 14小鼠

标本扫描条件: 电压55 kV; 电流114 μ A; 整合时间为250 ms; Voxelsize为15 μ m。d 30小鼠标本扫描条件: 电压70 kV; 电流114 μ A; 其余扫描条件同前。在顶骨中选择相等面积的区域进行骨量等数据统计, 同年龄小鼠采用相同阈值进行三维重建和数据计算。颅缝闭合程度统计参照Heuzé等方法^[21], 将小鼠冠状缝闭合程度分为四类: (1) 未闭合; (2) 骨桥; (3) 已闭合长度占冠状缝长度低于75%; (4) 已闭合长度占冠状缝长度占比大于75%, 统计各类头颅数量及其在总小鼠数中的比例。

1.5 颅骨标本切片及染色

体外培养及活体小鼠颅盖骨, 经4%PFA于4℃固定24 h后, PBS浸泡标本2 h, 15%EDTA脱钙直至颅骨软化, PBS洗标本3次, 按50%~100%系列酒精脱水, 二甲苯替换酒精、石蜡包埋, 石蜡切片常规进行。病毒处理后8 d的小鼠颅盖骨, 固定15%EDTA于4℃脱钙后行冰冻切片, 荧光检测。

1.6 苏木素-伊红(H-E)染色

石蜡切片二甲苯脱蜡、酒精梯度复水后, 苏木素染色1 min, 单蒸水5 min 2次, 1%盐酸酒精分色5 s, 清水浸泡3 min, 0.5%的伊红, 浸泡标本30 s, 单蒸水冲洗浸泡3 min, 95%酒精脱水, 树胶封片, 详细染色步骤参见文献^[22]。

1.7 统计学分析

数据处理采用SPSS 13.0软件, 两样本间进行独立样本t检验, 多组样本间进行双因素方差分析。以 $P < 0.05$ 代表具有统计学显著差异, $P < 0.01$ 代表具有统计学极显著差异。

2 结果

2.1 靶向剪切Fgfr2基因Cas9-gRNA的筛选及其对小鼠原代颅骨细胞生长的影响

根据在线软件设计了3条靶向小鼠Fgfr2基因的gRNA(命名为gRNA1-gRNA3), 分别靶向Fgfr2基因的6号、5号或2号外显子(见图1A)。将这三个gRNA序列分别连接到U6启动子下游驱动表达并与Cas9一起通过慢病毒包装, 将获得的慢病毒分别转染分离培养的原代颅骨细胞。对转染细胞的基因组DNA进行T7E1酶切验证后发现gRNA1、gRNA3对Fgfr2基因DNA序列有剪切作用, gRNA3的剪切效率较高(见图1B)。通过在线软件预测CRISPR/Cas9-gRNA3潜在脱靶基因, 并对这些可

能的脱靶位点进行T7E1酶切检测,发现gRNA3无显著脱靶作用(见图1C)。据此,本研究选取Cas9-gRNA3作为靶向剪切Fgfr2基因的gRNA进行后续研究。

文献报道Apert小鼠颅骨中突变的FGFR2-P253R异常激活下游ERK1/2和P38信号,磷酸化ERK1/2(P-ERK1/2)和磷酸化P38(p-P38)表达增加,引起细胞分化加快,进而导致颅缝早闭。为明确Cas9-gRNA抑制FGFR2表达后对Apert颅骨细胞分化的影响,我们检测了细胞的分化状态及相关信号分子表达变化。WB结果提示与转染不含gRNA的病毒对照组(Ctrl)相比,Cas9-gRNA慢病毒转染的WT和Apert颅骨细胞中FGFR2表达分

别降低了36.9%和33.3%(见图1D,1E)。FGFR2下游信号分子P-ERK1/2在Cas9-gRNA慢病毒转染的WT和Apert颅骨细胞中比对照组分别下降了51.7%($P < 0.01$)和19.1%($P < 0.05$),gRNA处理Apert细胞与Ctrl处理的WT颅骨细胞中的P-ERK1/2表达没有显著差异。p-P38表达检测结果与P-ERK1/2相似,gRNA处理WT和Apert颅骨细胞中p-P38比对照组分别下降了24.3%($P < 0.05$)和22.1%($P < 0.05$)(见图1D,1F,1G)。定量PCR检测成骨细胞分化相关标记基因*Osterix*、*Collagen I*、*Runx2*表达^[17,20],结果显示,与Ctrl处理WT细胞组比较,Ctrl处理Apert颅骨细胞中*Osterix*、*Collagen I*、*Runx2*表达分别增加了47.7%、64.9%

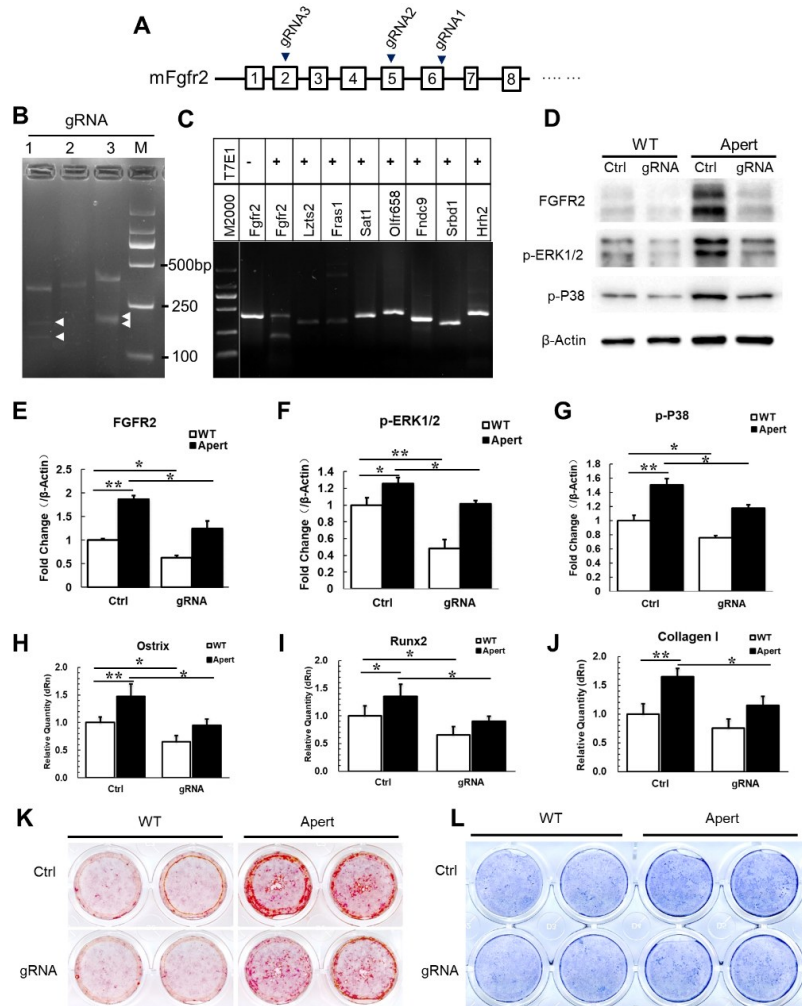


图1 靶向剪切Fgfr2基因gRNA的筛选及其对小鼠原代颅骨细胞的影响
A: 设计gRNA在小鼠Fgfr2基因位置示意图(黑框示外显子); B: T7E1酶切实验验证Cas9-gRNA的剪切作用; C: T7E1酶切验证表明gRNA靶向剪切Fgfr2基因,对预测的潜在脱靶基因无显著剪切作用; D: WB检测gRNA处理与否小鼠颅骨细胞FGFR2及其下游信号分子P-ERK1/2、P-P38表达; E-G: (D)中的FGFR2等分子表达条带的半定量光密度分析; H-J: 实时定量PCR检测颅骨成骨细胞标记基因*Osterix*、*Collagen I*、*Runx2*表达; K: Cas9-gRNA慢病毒转染并成骨诱导14 d的颅骨细胞茜素红染色; L: Cas9-gRNA慢病毒转染并成骨诱导14 d的颅骨细胞ALP染色。(Ctrl: 不含gRNA慢病毒对照组。*表示有显著差异 $P < 0.05$; **表示有极显著差异 $P < 0.01$)

图1 靶向剪切Fgfr2基因gRNA的筛选及其对小鼠原代颅骨细胞的影响

和34.9%,与Ctrl处理Apert细胞组比较,Cas9-gRNA处理的Apert细胞组 *Osterix*、*Collagen I*、*Runx2* 表达水平分别下降了35.2%、30.3%和33.3%,gRNA处理的Apert细胞组与Ctrl处理的Apert细胞组比较 *Osterix*、*Collagen I*、*Runx2* 表达水平没有显著差异,表明gRNA处理有效缓解了Apert颅骨细胞异常分化(见图1H~1J)。茜素红及ALP染色显示成骨诱导14 d的Apert颅骨细胞比WT细胞染色显著增强,而Cas9-gRNA处理的Apert细胞染色较对照病毒处理的Apert细胞染色显著降低,表明Apert颅骨细胞的异常分化和成熟得到有效缓解(见图1K,1L)。

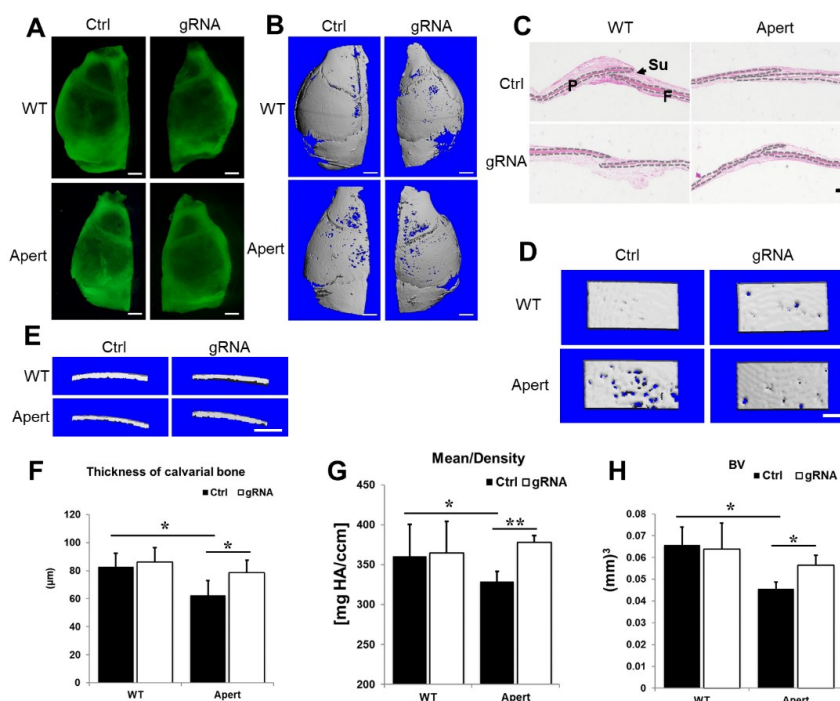
2.2 Cas9-gRNA处理缓解体外培养Apert颅盖骨畸形

分离体外培养新生WT及Apert小鼠颅盖骨,沿中缝(矢状缝)将其分成左右两半分别行不含gRNA的慢病毒(对照组,Ctrl)和Cas9-gRNA慢病毒处理。处理7 d后观察到颅缝及顶骨、额骨等部位均有较强GFP荧光,表明慢病毒有效感染培养的颅骨并表达目的基因(见图2A)。对培养的颅盖骨行microCT扫描及三维重建后观察发现,Cas9-gRNA处理可改善Apert冠状缝的早闭状态(见图

2B),冠状缝组织切片及H&E染色显示相似结果(见图2C)。新生Apert小鼠颅骨较WT颅骨的颅骨厚度(Thickness)(见图2E,2F)、骨密度(Bone Mineral Density, BMD)(见图2G)和骨体积(Bone Volume, BV)(见图2D,2H)分别降低了24.8%和8.72%、30.9%。Cas9-gRNA的慢病毒处理后,Apert小鼠颅骨的BV、颅骨厚度、BMD均升高到与WT颅骨无显著差异,表明Apert小鼠颅骨的异常表型有效缓解(见图2D~2H)。

2.3 Cas9-gRNA慢病毒注射降低活体Apert小鼠颅缝成骨相关标记基因表达

本研究进一步评估了Cas9-gRNA慢病毒在小鼠活体水平对Apert小鼠颅骨异常表型的治疗效果。首先,我们于新生d 0龄小鼠头颅皮下注射仅表达EGFP的慢病毒(Lenti-GFP),于d 8龄在颅骨及颅缝等部位观察到较强GFP荧光(见图3A,3B)。对新生d 0和d 4龄Apert小鼠及同窝WT小鼠进行Cas9-gRNA慢病毒颅骨局部注射,免疫组织荧光观察发现,FGFR2主要表达于冠状缝细胞、顶骨及额骨成骨前缘、外骨膜等部位(见图3C)。成骨细胞分化早期标记分子Collagen I (Col I) 主要在成骨前



A:慢病毒处理7 d后的颅盖骨EGFP荧光观察(Bar = 1 mm);B:培养7 d的颅盖骨CT扫描三维重建形态(Bar = 1 mm);C:培养颅盖骨中冠状缝石蜡切片及H&E染色(Su表示颅缝;P代表顶骨,F代表额骨,Bar = 0.1 mm);D:颅顶骨局部三维重建形态(Bar = 0.5 mm);E:颅顶骨局部纵切面示厚度变化(Bar = 0.5 mm);F:颅顶骨厚度统计;G-H:颅顶骨骨密度、骨体积(BV)统计分析。(*表示有显著差异 $P < 0.05$; **表示有极显著差异 $P < 0.01$; $n = 3$)

图2 Cas9-gRNA处理对体外培养的Apert颅盖骨的缓解作用

缘、外骨膜等部位表达。成骨细胞成熟标记分子 Osteocalcin (OC) [7, 20] 在颅骨成骨细胞、骨细胞、外骨膜等部位均有表达 (见图 3D, 3E)。荧光强度统计结果发现, 与对照组 (注射 Lenti-cas9, 不含 gRNA) 相比, 注射 Lenti-gRNA 的 WT、Apert 小鼠颅缝 FGFR2 表达分别降低了 21% ($P < 0.05$) 和 11.3% ($P < 0.05$), Collagen I 分子表达分别降低 19% ($P < 0.05$) 和 35.9% ($P < 0.01$)、Osteocalcin 表达分别降低了 28% ($P < 0.01$) 和 38% ($P < 0.01$), 表明 Lenti-Cas9-gRNA 注射后显著降低了 WT 及 Apert 小鼠颅骨的成骨细胞的分化和成熟。

2.4 Cas9-gRNA 注射有效缓解 Apert 小鼠颅骨畸形

颅骨局部注射 Cas9-gRNA 慢病毒后的 WT 及 Apert 小鼠, microCT 扫描及三维重建后 Cas9 病毒注射对 WT 小鼠冠状缝闭合程度无显著影响, 统计显示 Cas9-gRNA 病毒注射的 Apert 小鼠部分闭合

(Partially Fused) 和闭合 (Fused) 的数量总和占比为 63.63%, 而无 Cas9-gRNA 病毒注射的 Apert 小鼠的该比例为 90%, 表明 Cas9-gRNA 病毒注射可显著改善 Apert 冠状缝的闭合状态 (见图 4A, 4B)。对顶骨分析显示 Cas9-gRNA 病毒注射显著增加了 Apert 颅骨骨量 (见图 4C), 颅骨厚度显著增加 (见图 4D~4F)。Apert 颅骨的 BV, BV/TV 等骨量指标 (见图 4G, 4H) 有增加, 骨密度也显著提高 (见图 4I)。

3 讨论

Apert 综合征主要是 FGFR2 突变所致, 是较严重的颅缝早闭症。目前, Apert 综合征缺乏有效的治疗药物, 现有的松解颅缝等手术治疗方式, 往往需多次手术, 且并发症多, 难以达到良好的治疗效果, 亟待开发有效的生物治疗措施。近年来, 基因

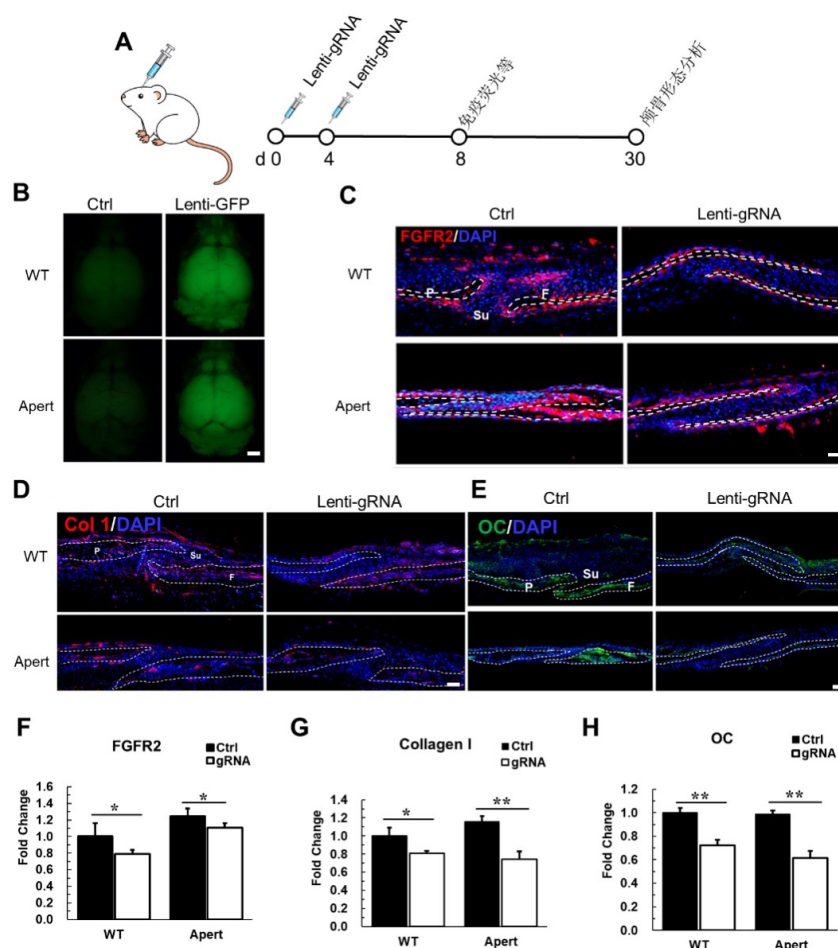


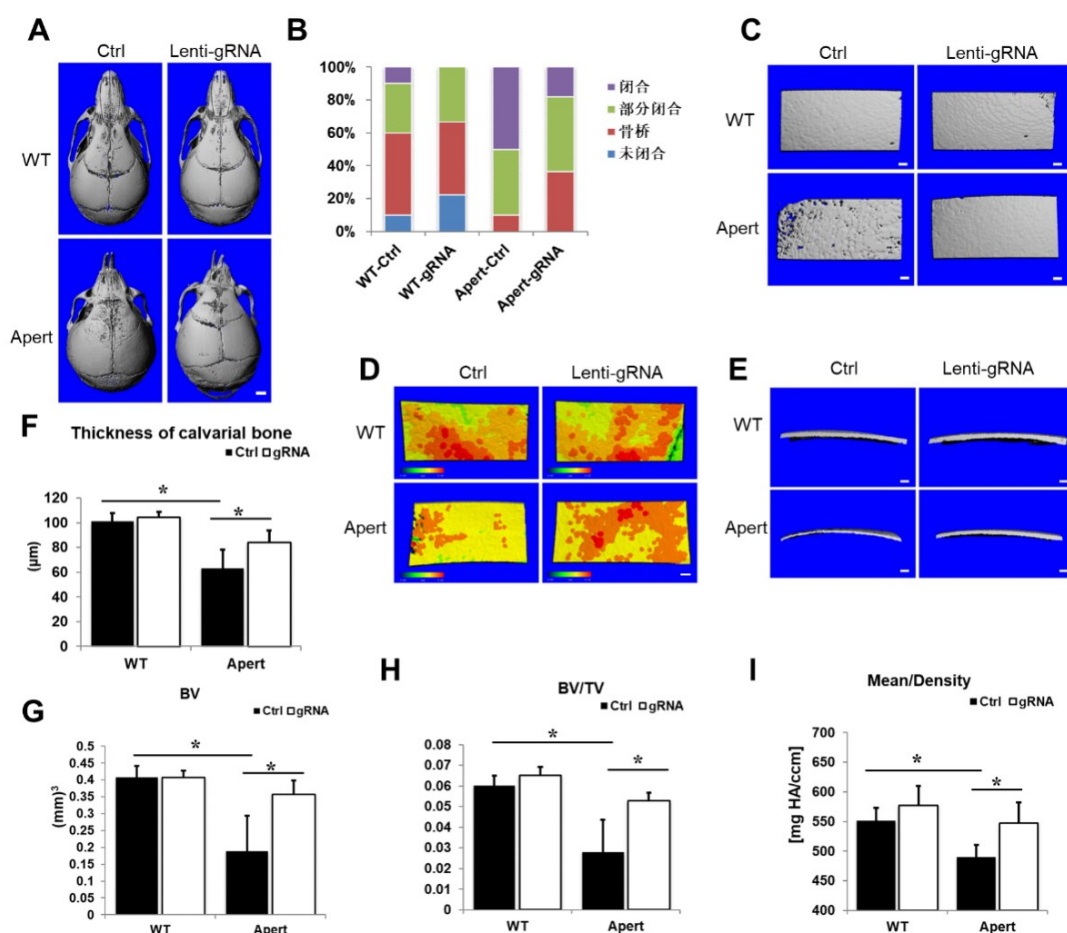
图3 Cas9-gRNA慢病毒注射降低活体Apert小鼠颅缝成骨相关标记基因表达
A:慢病毒小鼠颅骨局部注射及检测示意图; B:病毒注射8d的颅骨荧光观察; C:免疫荧光检测 Cas9-gRNA 慢病毒注射后8d冠状缝处 FGFR2 表达; D-E:免疫荧光检测 Cas9-gRNA 慢病毒注射后8d冠状缝处 Collagen I、Osteocalcin 表达。(*表示有显著差异 $P < 0.05$; **表示有极显著差异 $P < 0.01$; 每组重复 $n = 3$; B: bar = 1 mm; C~E: bar = 0.1 mm)

图3 Cas9-gRNA慢病毒注射降低活体Apert小鼠颅缝成骨相关标记基因表达

治疗被广泛用于治疗遗传病, 展示出强大的应用前景。Apert综合征成因是FGFR2突变后导致FGF信号分子与FGFR2结合增加, 持续性激活导致下游信号增强, 引起细胞功能改变。为减少基因治疗药物对其它分子、信号通路的影响, 最佳的Apert治疗应靶向FGFR2分子, 通过从基因序列、转录、转录后修饰、蛋白功能抑制等方面去干预FGFR2分子, 降低其下游信号。本实验室曾用AAV包装的靶向Fgfr2-P253R mRNA的shRNA局部注射颅骨, 从转录水平抑制Fgfr2表达后, Apert颅缝闭合状态和颅骨形态得到一定程度的改善^[20], 但由于shRNA对Fgfr2-P253R mRNA表达的抑制效率不高, 尚未治愈Apert颅骨畸形。CRISPR/Cas9为代表的基因编辑技术, 近年来在遗传病基因治疗中展现出强大潜力, 为Apert综合征的基因治疗带来希望。本研究探索用CRISPR/Cas9, 在DNA水平敲除

Fgfr2基因, 降低其表达, 初步结果证实, 应用CRISPR/Cas9基因编辑技术能减轻Apert颅盖骨异常表型, 为下一步开发CRISPR/Cas9治疗Apert综合征的相关药物提供实验室依据。

基于病毒的基因运载方式是基因治疗研究的常用方法, 慢病毒作为基因表达运载工具被广泛应用于医学研究中, 其优点在于运载容量大、表达稳定、表达时间较长, 缺点是外源基因会整合至受体基因组, 有潜在风险^[23]。腺相关病毒(Adeno-associated Viral Vector, AAV)不整合至宿主基因组, 相对安全, 但AAV运载容量较小, 不能装载SPCas9基因(长度约4.2 Kb)等的大片段^[24]。研究人员常用两种方法解决这一问题, 其一, 用来源于其它物种、序列更短的Cas9替代SPCas9基因进行AAV包装(如来自金黄色葡萄球菌的SaCas9); 其二, 将SPCas9进行拆分成两份(Split-SPCas9)分别包装、



A: 慢病毒注射后30 d的颅盖骨三维重建形态; B: 冠状缝闭合程度统计; C: 局部颅顶骨三维重建形态图; D: 局部颅顶骨厚度分布渲染图(颜色由绿至红厚度增加); E: 颅顶骨纵切面厚度; F: 颅顶骨厚度统计; G-I: 颅顶骨骨体积(BV)、骨体积分数(BV/TV)、骨密度统计。(*表示有显著差异 $P < 0.05$; **表示有极显著差异 $P < 0.01$). WT-Ctrl: $n = 10$, WT-Cas9: $n = 9$, Apert-Ctrl: $n = 10$, Apert-Cas9: $n = 11$; A: Bar = 1 mm, C-E: Bar = 0.1 mm)

图4 Cas9-gRNA注射缓解Apert小鼠颅骨畸形

分别表达。Split-SPCas9需要两半SPCas9在一个细胞中同时表达才会发挥作用, 所以治疗效果会降低。我们曾尝试用AAV包装SaCas9(序列长度约3.3 Kb)^[25]的方式处理Apert颅骨细胞, 但是剪切效率极低, 没有显著治疗效果, 因此本研究选用慢病毒作为运送CRISPR/Cas9在颅骨表达的工具。此外, 非病毒的运载方式如脂质体纳米颗粒等也可尝试用于今后的颅骨基因治疗中^[26]。

冠状缝早闭是导致Apert颅骨畸形的主要原发部位^[4, 6, 7], 本研究探索的CRISPR/Cas9治疗主要针对Apert冠状缝和颅盖骨。然而, 除了颅盖骨异常外, Apert综合征还有颅底变短、大脑后部形态改变、四肢变短、并指(趾)等畸形^[6, 7, 10, 11], 仅对颅盖骨(颅缝)进行局部干预还不够, 在今后研究中, 应重点考虑用系统给药方式对Apert综合征进行全身治疗。此外, 给药时间点、给药浓度优化等需要进一步探索。Apert综合征是在发育早期即出现异常的疾病, 小鼠在出生前(E18.5)就被发现冠状缝开始闭合, 新生Apert小鼠头颅已经表现出畸形症状, 所以, 仅仅用分子治疗缓解作用有限。今后的治疗探索应加强手术后的药物干预研究, 寻找抑制颅缝再造后再次闭合的药物。除用基因编辑外, 应积极探索其它方式如干细胞等治疗Apert综合征颅缝早闭, 如最近Yu等人对Twist1^{+/+}颅缝早闭小鼠进行颅缝再造术后, 植入Gli1⁺阳性的间充质干细胞, 构建了新的、正常生长的颅缝, 有效缓解颅缝早闭症状^[27]。

简言之, 本研究证明CRISPR/Cas9作用后Apert小鼠颅骨细胞分化状态、体外培养的颅骨以及活体小鼠冠状缝早闭程度均有显著减轻, 异常降低的颅骨骨量、骨密度等也显著升高, 表明CRISPR/Cas9基因编辑可缓解Apert小鼠头颅的异常状态。本研究为Apert综合征的基因编辑治疗提供了实验依据, 有望为Apert综合征及其它骨骼遗传病的临床治疗提供新的策略。

参考文献

- [1] OPPERMAN L A. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites[J]. *Dev Dyn*, 2000, 219(4): 472-485.
- [2] CORNELISSEN M, OTTELANDER B D, RIZOPOULOS D, et al. Increase of prevalence of craniosynostosis[J]. *J Cranio Maxill Surg*, 2016, 44(9): 1273-1279.
- [3] HINOJOSA J. Syndromic craniosynostosis[M]. *Textbook of pediatric Neurosurgery*: Springer International Publishing AG, 2018.
- [4] SAID C A, REDDY S, SHUKLA V, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) mutation related syndromic craniosynostosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(12): 1479-1488.
- [5] SU N, JIN M, CHEN L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models[J]. *Bone Res*, 2014, 2(14003): 1-24.
- [6] WANG Y L, SUN M, UHLHORN V L, et al. Activation of P38 MAPK pathway in the skull abnormalities of Apert syndrome Fgfr2^{+/P253R} mice[J]. *BMC Dev Biol*, 2010, 10(22): 1-20.
- [7] YIN L, DU X, LI C, et al. A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. *Bone*, 2008, 42(4): 631-643.
- [8] BREIK O, MAHINDU A, MOORE M H, et al. Apert syndrome: surgical outcomes and perspectives[J]. *J Cranio Maxill Surg*, 2016, 44(9): 1238-1245.
- [9] PROCTOR M R, MEARA J G. A review of the management of single-suture craniosynostosis, past, present, and future[J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2019, 24(6): 622-631.
- [10] CHEN L, LI D, LI C, et al. A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis[J]. *Bone*, 2003, 33(2): 169-178.
- [11] WANG Y, XIAO R, YANG F, et al. Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/-S252W) mouse[J]. *Development*, 2005, 132(15): 3537-3548.
- [12] SHUKLA V, COUMOUL X, WANG R H, et al. RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis[J]. *Nature Genet*, 2007, 39(9): 1145-1150.
- [13] YOKOTA M, KOBAYASHI Y, MORITA J, et al. Therapeutic effect of nanogel-based delivery of soluble FGFR2 with S252W mutation on craniosynostosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): 1-12.
- [14] XU W, LUO F, WANG Q, et al. Inducible activation of

- FGFR2 in adult mice promotes bone formation after bone marrow ablation[J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(11): 2194-2206.
- [15] WU S S, LI Q C, YIN C Q, et al. Advances in CRISPR/Cas-based gene therapy in human genetic diseases[J]. *Theranostics*, 2020, 10(10): 4374-4382.
- [16] OU Z H, NIU X H, HE W Y, et al. The combination of CRISPR/Cas9 and iPSC technologies in the gene therapy of human β -thalassemia in mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(32463): 1-13.
- [17] SHIMO T, HOSOKI K, NAKATSUJI Y, et al. A novel human muscle cell model of duchenne muscular dystrophy created by CRISPR/Cas9 and evaluation of antisense-mediated exon skipping[J]. *J Hum Genet*, 2018, 63(3): 365-375.
- [18] RUAN G X, 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.
- [19] GUAN Y, MA Y, LI Q, 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.
- [20] LUO F, XIE Y, WANG Z, et al. Adeno-associated virus-mediated RNAi against mutant alleles attenuates abnormal calvarial phenotypes in an Apert syndrome mouse model[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 291-302.
- [21] HEUZÉ Y, SINGH Y, BASILICO C, et al. Morphological comparison of the craniofacial phenotypes of mouse models expressing the Apert FGFR2 S252W mutation in neural crest- or mesoderm-derived tissues[J]. *Bone*, 2014, 63: 101-109.
- [22] LUO F T, XIE Y L, XU W, et al. Deformed skull morphology is caused by the combined effects of the maldevelopment of calvarias, cranial base and brain in FGFR2-P253R mice mimicking human Apert syndrome[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(1): 32-45.
- [23] XU C L, RUAN M Z C, MAHAJAN V B, et al. Viral delivery systems for CRISPR[J]. *Viruses*, 2019, 11(28): 1-12.
- [24] WANG D, TAI P W L, GAO G P. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358-378.
- [25] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. In vivo genome editing using staphylococcus aureus Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191.
- [26] BUCK J, GROSSEN P, CULLIS P R, et al. Lipid-based DNA therapeutics: hallmarks of non-viral gene delivery[J]. *ACS nano*, 2019, 13(4): 3754-3782.
- [27] YU M F, MA L, YUAN Y, et al. Cranial suture regeneration mitigates skull and neurocognitive defects in craniosynostosis[J]. *Cell*, 2021, 184(1): 243-256.e18.
- [收稿日期] 2020-12-13

(上接第7页)

- Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(4): 512-524.
- [36] SOREE P, GUPTA R K, SINGH K, et al. Raised HIF1 α during normoxia in high altitude pulmonary edema susceptible non-mountaineers[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26468.
- [37] ITO M, TANAKA T, ISHII T, et al. Prolyl hydroxylase inhibition protects the kidneys from ischemia via upregulation of glycogen storage[J]. *Kidney Int*, 2020, 97(4): 687-701.
- [38] SAVYUK M, KRIVONOSOV M, MISHCHENKO T, et al. Neuroprotective effect of HIF prolyl hydroxylase inhibition in an in vitro hypoxia model[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(8): 662.
- [39] HAN F, WU G F, HAN S C, et al. Hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) alleviates sepsis-induced acute lung injury[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2020, 281: 103506.
- [40] ZIELNIOK K, BURDZINSKA A, KALETA B. a HIF prolyl hydroxylase inhibitor, improves immunomodulatory properties of human mesenchymal stromal cells[J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2396.
- [41] 吴刚, 高文祥, 高钰琪. HIF-1: 高原肺水肿防治的新靶点[J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2020, 41(1): 8-10.
- [收稿日期] 2020-12-28