

CRISPR/Cas9 基因编辑在心血管领域的应用进展

刘洪娟 徐亚伟

(上海市第十人民医院心内科, 上海 200072)

【摘要】 CRISPR/Cas9 是一种新的基因干预手段, 已广泛应用于肿瘤和罕见病的临床治疗, 但在心血管研究中应用有限, 现分别对心脏发育、心血管疾病(如动脉粥样硬化、心力衰竭等)等相关领域研究进行总结归纳, 以提取有效信息结合自身研究方向, 促进 CRISPR/Cas9 在心血管基础研究中的应用。

【关键词】 CRISPR/Cas9; 心血管; 基因编辑

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.12.015

Application Progress of CRISPR/Cas9 Gene Editing in Cardiovascular Field

LIU Hongjuan, XU Yawei

(Department of Cardiology, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072, China)

【Abstract】 CRISPR/Cas9 is a new genetic intervention method, which has been widely used in the clinical treatment of tumors and rare diseases, but its application in basic research on cardiovascular diseases is limited. Therefore, this article focuses on cardiac development and cardiovascular diseases (such as atherosclerosis, heart failure, etc.) and other related basic researches are summarized in order to extract effective information and combine their own research directions to promote the application of CRISPR/Cas9 in cardiovascular basic research.

【Key words】 CRISPR/Cas9; Cardiovascular; Gene editing

基因疗法具有治疗 1 万多种人类单基因疾病的潜力, 并能使更多的复杂多基因疾病受益。CRISPR/Cas 系统是原核生物的一种天然免疫系统, 存在于大多数细菌和古生菌中。原核生物在遭到病毒入侵后, 能够把病毒 DNA 的一小段提取出来并存储到自身基因组上的特定区域, 把这个区域称为 CRISPR 存储空间。当再次遇到病毒入侵时, 原核生物能够根据存储的 DNA 片段识别病毒, 将病毒的 DNA 切断而使之失效。根据 CRISPR/Cas 系统的特性, 科学家将其改造成了目前最高效的基因组编辑工具^[1]。其中, CRISPR/Cas9 是一种古老的细菌免疫防御系统, 于 2002 年首次在原核生物中鉴定, 被重新应用到基因编辑技术中, 为研究人员提供了一种革命性的基因疗法工具^[2], 2012 年, Jennifer 和 Emmanuelle 证明 CRISPR/Cas9 系统可以在体外切割双链 DNA^[1]; 2013 年, 张锋首次用 CRISPR/Cas9 系统在原核生物(大肠杆菌)中实现基因组编辑^[3], 目前尚无相关临床水平的应用^[4-5]。天然的 CRISPR/Cas9 系统由三部分组成: SpCas9(以下简称 Cas9)、crRNA 和 tracrRNA。其中, crRNA 和 tracrRNA 通过局部碱基配对组成 guide RNA

(gRNA), gRNA 与 Cas9 蛋白结合后引导 Cas9 蛋白识别和切割目标 DNA 序列(图 1)。Cas9 蛋白要成功识别目标序列必须满足两个条件: (1) sgRNA 的 5' 端 20 nt 和靶 DNA 之间碱基配对; (2) 靶 DNA 的 3' 端有合适的前间区序列邻近基序(PAM)序列。CRISPR/Cas9 切割目标 DNA 后产生双链断裂(DSB)^[6]。CRISPR/Cas9 最基础的技术就是基因敲除, 即在基因的上下游各设计一条 gRNA(gRNA1 和 gRNA2), 将其与含有 Cas9 蛋白编码基因的质粒一同转入细胞中, 向导 RNA 通过碱基互补配对可以靶向 PAM 附近的目标序列, Cas9 蛋白会使该基因上下游的 DNA 双链断裂, 实现细胞中目标基因的敲除[非同源末端连接(NHEJ)修复]^[7]。另外, 在此 NHEJ 修复基础上为细胞引入修复模板质粒(供体 DNA 分子), 会引入片段插入或定点突变, 实现基因的替换或者突变[进行同源介导的双链 DNA 修复(HDR)], 例如对受精卵细胞进行基因编辑, 并将其导入代孕母体中, 可以实现基因编辑动物模型的构建^[8]。目前, CRISPR/Cas 技术已经被广泛地应用于基因激活, 疾病模型构建, 甚至是基因治疗等相关领域, 以往基因编辑同细胞精确编

辑的效率通常很低^[9],而 CRISPR/Cas9 提供可靶向特定精确位点^[10],并且能同时干扰靶向多个基因^[11](详见图 1),为研究复杂的多基因疾病提供了新的可能性,特别适用于体外和体内的不同研究,并已用于评估基因功能、疾病建模、转录调控和测试新型治疗方法等多项研究^[12]。目前 CRISPR/Cas9 在肿瘤和遗传疾病治疗中应用较广泛,如肺小细胞癌、胃癌、大肠癌及罕见疾病治疗等^[13-15]。正在进行的大多数肿瘤临床治疗试验都采用 CRISPR/Cas9 来创建用于癌症免疫疗法的嵌合抗原受体 T 细胞基因编辑 (CAR-T)^[16-17]。CRISPR 系统还用于非基因编辑目的,例如激活和抑制基因表达,以及用于荧光定位标记染色体区域和单个 mRNA^[18]。另外,CRISPR/Cas9 基因编辑已成功构建多种模式动物,如转基因绵羊和基因敲除猪等^[19-20]。在过去的十年中,基因组编辑技术的发展从根本上改变了生物医学研究,在肿瘤科研和临床领域已经得到广泛应用,但在心血管领域的相关研究值得总结和探讨。

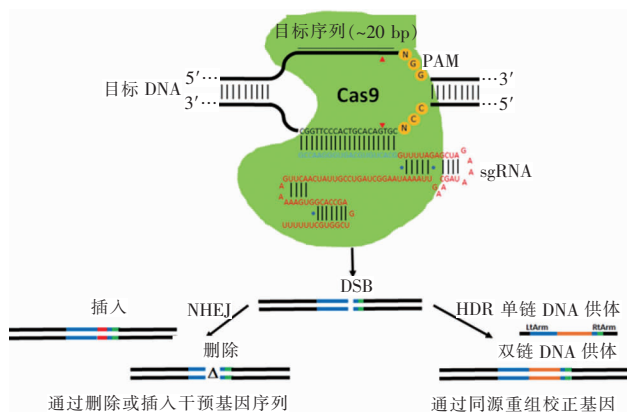


图 1 CRISPR/Cas9 原理图

心血管疾病是中国老年人发病和死亡的主要原因之一,被认为是主要的公共卫生问题。目前基因组编辑工具已被用于探究诸如心肌病、心律不齐等心血管相关疾病的作用机制^[12]。且已有研究表明在心肌细胞中特异性表达 Cas9 并不会影响心脏功能或相关基因表达,Cas9 特异性敲入小鼠已被用于编辑心脏 Myh6、Sav1 和 Tbx2061 等基因,但目前心血管领域的治疗性基因组编辑研究有限^[21]。以下将更具体地描述二者相关研究进展。

1 心脏发育

在心血管系统开始运转之前,胚胎主要通过弥散的方式获取营养和氧气,然而,随着胚胎发育需要,心脏发育将在后续发挥重要作用^[22]。研究表明 CRISPR/Cas9 通过干预心脏再生中的小孔蛋白,心脏发育中的心脏祖细胞迁移和 Wnt/ β -Catenin 信号转导构建斑马鱼心脏发育模型^[22]。除了构建动物模型,

CRISPR/Cas9 还可以通过进行种系基因组编辑参与心脏发育,开发为遗传性心脏病的治疗工具,如使用 CRISPR/Cas9 在人类生殖细胞中实现对引起肥厚型心肌病的 MYBPC3 突变的校正^[23]。利用 CRISPR/Cas9 系统生成 gtpbp3 基因敲除斑马鱼,发现 gtpbp3 敲除斑马鱼线粒体 tRNA 代谢异常,异常的线粒体 tRNA 代谢损害线粒体翻译,产生蛋白酶抑制应激,改变呼吸链复合物的活性,导致胚胎心脏发育的改变,并减少突变斑马鱼心室的短缩,而敲除 gtpbp3 基因的斑马鱼心室心肌细胞肥大,心肌纤维紊乱^[24],提示 CRISPR/Cas9 通过干预相关基因编辑参与心脏发育。

2 动脉粥样硬化/心力衰竭

CRISPR/Cas9 基因编辑调控心血管相关疾病进展是目前研究热点。如:通过 CRISPR/Cas9 敲除 ApoE/ApoC3 基因可构建动脉粥样硬化大鼠模型^[25-26];体内 AAV-CRISPR/Cas9 介导的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 基因剪辑可部分挽救 LDLR 表达并有效改善 LDLR 突变体诱导动脉粥样硬化表型^[27-28]。用慢病毒载体转染 Cas9,并引导 RNA 在谱系阴性的骨髓细胞中引入 Tet2 和 Dnmt3a 失活突变,将细胞植入到化疗小鼠体内,持续注射血管紧张素 II, Tet2 或 Dnmt3a 失活突变的小鼠表现出更明显的心肌肥厚,心功能减弱,以及更严重的心脏和肾脏纤维化^[29]。通过 CRISPR/Cas9 靶向 Me2d 表达的 gRNA 载体可以有效构建心肌肥大表型^[30]。将 CRISPR/Cas9 与短模板寡核苷酸结合,在斑马鱼的同源基因中产生四种携带不同的导致人类心血管疾病 ATP 敏感钾通道与 Cantu 综合征相关 (Kir6.1、KCNJ8、SUR2 和 ABCC9) 的基因突变,导致心室明显增大,心输出量和收缩功能增强,脑血管明显扩张^[31]。以上说明基因编辑在诱导心血管疾病中具有重要作用,同时其治疗心血管疾病基础研究中也发挥同等作用,如: CRISPR/Cas9 介导 FKBP5 基因缺失,通过正反馈回路增强 FKBP5 对核因子 κ B 的反应,具有治疗急性心肌梗死的作用^[32]。CRISPR/Cas9 敲入表达双重趋化因子 GCP-2 和 SDF-1 α 的骨髓间充质干细胞可能是缺血性血管疾病的替代治疗选择^[33]。即 CRISPR/Cas9 为心血管相关疾病研究提供新的方法论。

3 心血管临床前基因治疗研究

目前在临床水平通过基因组编辑可以治疗或预防两种类型的心血管疾病,第一类是心血管伴有遗传的疾病,如肥厚型心肌病、扩张型心肌病、先天性长 QT 综合征和引起心脏功能障碍的肌肉营养不良,第二类是马凡综合征和家族性肺动脉高压等疾病^[19,21]。另外,随着人类诱导多能干细胞的发展,CRISPR/Cas9 敲除和敲入特定基因的干细胞可显著增加治疗心血管

疾病的可能性^[34]。如采用 CRISPR/Cas9 技术将 TALEN 基因敲入人类诱导的多能干细胞衍生的心肌细胞中,以纠正 PLN 基因中与扩张型心肌病相关的基因突变,并在体内(通过腺相关病毒)向小鼠施用该系统,被证明可改善压力超负荷期间或诱发心肌梗死后的心脏功能^[21,27]。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 基因在调节胆固醇稳态中起着重要作用,PCSK9 基因的功能获得性突变可导致高胆固醇血症和相关的动脉硬化,CRISPR/Cas9 敲除 PCSK9 基因将增加成年小鼠的 LDLR 表达并实现临床治疗作用^[22],提示 CRISPR/Cas9 在心血管疾病基础研究治疗中均发挥有效作用,但目前尚无心血管领域的直接临床应用。

综上,CRISPR/Cas9 代表了基因组编辑技术的突破性进展,为在体外和体内操纵基因组开辟了新途径,尽管到目前为止,小型动物模型研究已经稳定,但仍存在部分基因脱靶效应,会延长基础研究及临床治疗时间,目前无法在人类心脏中进行基因校正,在心血管中的应用主要集中在遗传性心脏病临床前动物模型中的直接治疗干预和基础研究^[35],因此可结合相关课题相关研究,发掘新的疾病关键靶点后,采用基因编辑技术干预相关基因,实现基因治疗心血管疾病的可行方案。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination [J]. *Nature*, 1985, 317 (6034): 230-234.
- [3] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23 (R1): R40-R46.
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 819-823.
- [5] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 823-826.
- [6] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157 (6): 1262-1278.
- [7] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343 (6166): 84-87.
- [8] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159 (2): 440-455.
- [9] Torphy TJ, Fine CF, Burman M, et al. Lower esophageal sphincter relaxation is associated with increased cyclic nucleotide content [J]. *Am J Physiol*, 1986, 251 (6 Pt 1): G786-G793.
- [10] Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 1911.
- [11] 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.
- [12] Vermersch E, Jouve C, Hulot JS. CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116 (5): 894-907.
- [13] Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (22): 2059-2074.
- [14] Biagioni A, Skalamera I, Peri S, et al. Update on gastric cancer treatments and gene therapies [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38 (3): 537-548.
- [15] Matano M, Date S, Shimokawa M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (3): 256-262.
- [16] Zych AO, Bajor M, Zagodzón R. Application of genome editing techniques in immunology [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2018, 66 (4): 289-298.
- [17] Memi F, Ntokou A, Papangelis I. CRISPR/Cas9 gene-editing: research technologies, clinical applications and ethical considerations [J]. *Semin Perinatol*, 2018, 42 (8): 487-500.
- [18] Garmy-Susini B, Delmas E, Gourdy P, et al. Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation [J]. *Circ Res*, 2004, 94 (10): 1301-1309.
- [19] Yamamoto S, Ooshima Y, Nakata M, et al. Efficient gene-targeting in rat embryonic stem cells by CRISPR/Cas and generation of human kynurenine aminotransferase II (KAT II) knock-in rat [J]. *Transgenic Res*, 2015, 24 (6): 991-1001.
- [20] Fan Z, Perisse IV, Cotton CU, et al. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene [J]. *JCI Insight*, 2018, 3 (19): e123529.
- [21] Nishiga M, Qi LS, Wu JC. Therapeutic genome editing in cardiovascular diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 168: 147-157.
- [22] Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, et al. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases [J]. *Mol Ther*, 2021, 29 (2): 571-586.
- [23] Zeng Y, Li J, Li G, et al. Correction of the Marfan syndrome pathogenic FBN1 mutation by base editing in human cells and heterozygous embryos [J]. *Mol Ther*, 2018, 26 (11): 2631-2637.
- [24] Chen D, Zhang Z, Chen C, et al. Deletion of Gtpbp3 in zebrafish revealed the hypertrophic cardiomyopathy manifested by aberrant mitochondrial tRNA metabolism [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (10): 5341-5355.
- [25] Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, et al. Targeted germline modifications in rats using CRISPR/Cas9 and spermatogonial stem cells [J]. *Cell Rep*, 2015, 10 (11): 1828-1835.
- [26] Guo M, Xu Y, Dong Z, et al. Inactivation of ApoC3 by CRISPR/Cas9 protects against atherosclerosis in hamsters [J]. *Circ Res*, 2020, 127 (11): 1456-1458.
- [27] Zhao H, Li Y, He L, et al. In vivo AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2020, 141 (1): 67-79.
- [28] Wang L, Luo JY, Li B, et al. Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow [J]. *Nature*, 2016, 540 (7634): 579-582.
- [29] Sano S, Oshima K, Wang Y, et al. CRISPR-mediated gene editing to assess the roles of Tet2 and Dnmt3a in clonal hematopoiesis and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2018, 123 (3): 335-341.
- [30] Schoger E, Carroll KJ, Iyer LM, et al. CRISPR-mediated activation of endogenous gene expression in the postnatal heart [J]. *Circ Res*, 2020, 126 (1): 6-24.
- [31] Hofsteen P, Robitaille AM, Chapman DP, et al. Quantitative proteomics identify DAB2 as a cardiac developmental regulator that inhibits WNT/ β -catenin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (4): 1002-1007.
- [32] Zannas AS, Jia M, Hafner K, et al. Epigenetic upregulation of FKBP5 by aging and stress contributes to NF- κ B-driven inflammation and cardiovascular risk [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (23): 11370-11379.
- [33] Jeong IS, Park Y, Ryu HA, et al. Corrigendum to "dual chemotactic factors-secreting human amniotic mesenchymal stem cells via TALEN-mediated gene editing enhanced angiogenesis" [Int. J. Cardiol. 260 (2018) 156-162] [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 263: 186.
- [34] Doetschman T, Georgieva T. Gene editing with CRISPR/Cas9 RNA-directed nuclease [J]. *Circ Res*, 2017, 120 (5): 876-894.
- [35] German DM, Mitalipov S, Mishra A, et al. Therapeutic genome editing in cardiovascular diseases [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4 (1): 122-131.

收稿日期: 2021-05-15