

MeCP2转基因食蟹猴所表征的类自闭症行为及种系传递

仇子龙, 李霄

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 中国科学院神经科学研究所; 神经科学国家重点实验室, 上海 200031

摘要 自闭症是近年来公众关注度很高的一种神经系统疾病, 甲基化 CpG 结合蛋白 2 (MeCP2) 因其能够在转录水平调节基因表达和操控微小 RNA (miRNA) 的效应而在自闭症中扮演着重要的角色。当 MeCP2 因突变而功能缺失时会导致瑞特综合症 (Rett syndrome), 而当 MeCP2 拷贝数过多则会导致一种名为 MeCP2 重复综合症的自闭症。虽然目前科学家已经构建成功了 MeCP2 的转基因小鼠, 但在这种小鼠模型中无法很好地观察到类似人类自闭症的表型。本研究组通过慢病毒侵染的方法构建了能在神经系统中特异表达人源 MeCP2 的转基因食蟹猴模型, 并通过深度测序检测出了转基因插入位点以及通过免疫印迹 (western blot) 确证了外源基因的表达。该转基因食蟹猴模型在行动、社交及情绪方面表现出明显的类似自闭症行为, 并呈现转基因的种系传递现象。这些结果表明通过基因编辑技术构建非人灵长类模型在脑疾病研究中的重要性。

关键词 自闭症; MeCP2 转基因; 社交行为异常; 种系传递

随着人类社会的发展及科学技术的进步, 对人类生命健康造成严重威胁的一些疾病如天花、疟疾、结核等, 已得到有效的控制, 并能够进行妥善的治疗。但新的疾病如癌症、代谢性疾病、神经系统疾病等又再次站在了人们面前, 成为人们追求美好生活之路上的“拦路虎”, 大众谈之色变, 专业人士欲攻克之而后快, 社会各界都对这些健康“拦路虎”们给予高度的关注。在这些新时代的健康拦路虎中, 自闭症因其逐年递增的发病率、高度复杂的发病机制及表征、以及如《雨人》《海洋天堂》这样艺术作品的描写, 成为公众关注度很高的一种神经系统疾病。

在普罗大众的印象中, 自闭症像是一种性格标签, 可以不吝惜地贴在那些不善社交、少与别人交流、性情内向的人的身上。然而对于医学和神经科学相关的专业人士而言, 自闭症却并不是一张意如其名的标签, 能够轻易地贴出来。

自闭症的首次临床定义是在 20 世纪 40 年代由美国医生 Kanner 提出的^[1], 经过几十年的发展, 专业领域一般认为自闭症 (autism) 是一类广泛性神经系统发育性疾病^[2], 包括: 瑞特综合症 (Rett syndrome)、阿斯伯格综合症 (Asperger syndrome)、童年瓦解性障碍等病症。由于是发育性疾病, 所以患者从婴幼儿便开始发病, 主

收稿日期: 2017-11-30; 修回日期: 2018-03-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (XDB02050400); 国家自然科学基金项目 (91432111, 91232712, 81527901)

作者简介: 仇子龙, 研究员, 研究方向为神经系统疾病, 电子邮箱: zqiu@ion.ac.cn

引用格式: 仇子龙, 李霄. MeCP2 转基因食蟹猴所表征的类自闭症行为及种系传递[J]. 科技导报, 2018, 36(7): 48-55; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2018.07.008

要的病因则是会影响到发育过程的遗传、免疫、孕期理化因子刺激等因素。患者的临床表现主要在:(1)对父母不产生依恋,不能与同龄儿童建立伙伴关系等此类社会交往行为的障碍;(2)无法用动作表达自己意愿,语言运用和理解能力缺失等此类交流性障碍;(3)无法对玩具感兴趣,重复蹦跳,重复机械性动作等此类兴趣缺失及重复刻板性行为,另有少量病患出现癫痫、智力低下、个体发育迟缓等较严重病症^[3-5]。

近几十年来,随着生命科学的日新月异,对于自闭症的研究和理解也越来越深入,从早期的临床病理层面,逐步深入到细胞以分子的病理层面,使得人们对于自闭症的发生、病程进展以及治疗有了更全面和精细的了解。目前的研究结果显示:自闭症并不是神经系统严重的、明显的损伤,而是与神经系统的发育过程及功能具有相关性,其中最重要的则是与神经突触功能与调节息息相关^[6]。对于神经系统而言,神经元是此系统的核心,也是最基本的功能单位。神经元彼此之间相互连接才能顺畅地传递神经信号,完成最基本的神经功能。而神经元彼此之间的连接阵列,构成行使高级神经活动的基础。在此,神经元间相互连接的界面被称为神经突触^[7-9],由此可以理解突触对于神经系统的重要性。有趣的是,神经元间的连接并不是静态的,而是一直处于动态的变化当中,旧的不需要的突触消失,新的突触又形成,在这个此消彼长的过程中,消失与形成却不是随机而是处于精密的调控机制操纵之下的^[10-13]。那些与突触这个微小却又重要的结构以及调控这个结构消亡产生相关的生命源代码——基因,毫无疑问,也与自闭症有着密切而重要的联系^[14]。

在一系列与自闭症相关的基因中,一个名叫甲基化 CpG 岛结合蛋白 2(*MeCP2*)的基因,以其有趣的特征吸引了研究者的注意。*MeCP2* 基因是一种甲基化 DNA 结合蛋白,它虽然不直接参与到神经突的结构和功能中,但却可以通过结合 DNA 的甲基化 CpG 岛或是招募转录因子操纵与神经突触功能及调控相关基因的表达,从而间接地对神经功能造成影响^[15-18]。当 *MeCP2* 基因因突变或者缺失丧失功能时,可导致瑞特综合症^[19];而当 *MeCP2* 由于复制异常而导致拷贝数增多时,却又会导致另一类被称为 *MeCP2* 重复综合症(*MeCP2* duplication syndrome)的自闭症^[20]。由此可见,体内 *MeCP2* 这个基因的表达量如同一座天平,必须保持精妙的平衡,无论过多或者过少,都会导致神经突触及神

经系统功能的异常,从而导致自闭症。

然而,仅仅知道了遗传背景和分子机制,对于治疗自闭症还是远远不够的。如何为发病过程提供一个观察窗口以及为治疗方案提供一个测试平台也是非常重要的,近年来基因编辑技术及模式动物的发展对此提供了非常有利的条件。现有的研究结果已经报道了 *MeCP2* 基因敲除的小鼠模型,该模型的确展现出与瑞特综合症非常相似的表型,为瑞特综合症的观察和治疗提供了便利;同时, *MeCP2* 转基因(过表达)的小鼠模型也同样已得到建立,该模型也展现出明显的社交功能障碍^[21-22]。但自闭症毕竟涉及多种复杂的高级神经活动,如精细运动、情绪、社交交流等,目前在生命科学领域广泛使用的小鼠、大鼠这样的动物模型,虽然具有成长和生命周期较短、遗传操作技术成熟便捷等优点,但由于进化位置较低,神经系统的结构和功能较简单,缺乏与自闭症相关的一些关键表型和特征。如果要为临床研究与治疗提供更为有力的支持,小鼠已显得捉襟见肘,更高级的动物模型和更复杂的神经系统是非常必要的。

1 材料与方法

1.1 *MeCP2* 转基因食蟹猴的建立和鉴定

该项目中所使用食蟹猴的饲养与操作按照上海生命科学研究院(中国科学院)生物医学研究伦理委员会所批准的“生殖”应用指南进行(#ER-SIBS-221106P)。在 hCG 刺激 32~36 h 后收集卵母细胞,体外培养至中期 II 进行慢病毒注射,注射后进行体外受精,之后进行胚胎移植入排卵后 0~3 d 的代孕雌食蟹猴的输卵管中。新生食蟹猴采用发根组织提取 DNA 进行初步的基因组鉴定。慢病毒为上海 SBO 医学与生物技术有限公司提供,效价 1010 vg/mL。

1.1.1 转基因基因组整合位点的鉴定

采取实验对象 2 μ g 基因组,使用超声波将基因组打断 500~700 bp 的片段,3' 端加 A 后连接 Y 形接头,使用不对称引物 PCR (APP) 对病毒插入位点进行富集,并构建使用 Illumina 接头的测序文库,建库成功后通过 Illumina Miseq 测序,对融合有病毒序列的食蟹猴基因组片段进行筛选,并通过比对食蟹猴基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=crab+eating+monkey>)绘制病毒插入位点的全基因组图谱。

1.1.2 Western Blot确定外源 MeCP2 转基因的表达

使用 RIPA 对流产猴的脑组织进行匀浆, BCA 法测定浓度后, 30 μg 蛋白样本进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜后进行 MeCP2 (Cell Signaling, 3456S)、HA (Abcam, ab91110) 和 GFP (Invitrogen, A11122) 的免疫印迹。

1.2 体征观察

在食蟹猴的日常饲养中, 每月对实验个体进行体重测量与记录。

血液质谱分析: 由兽医对实验食蟹猴进行早晨空腹采血, 全血 (200~400 μL) 采集于采血滤纸之上, 空气干燥后低温保存, 使用 AB SCIEX 公司的 API2000 对血样进行质谱分析, 得到血液游离脂肪酸与氨基酸含量。

1.3 行为学实验

行为学实验于每日上午及下午进行, 行为学实验均为单一进行, 即一时间段内只进行一项行为学实验以避免干扰。行为学实验记录由 2 位独立的实验者进行分析, 实验及分析过程中, 实验者对实验对象的分组情况未知 (双盲)。

1.3.1 独立观察实验

将实验对象从所生活的社群中单独分离出, 转移入与日常生活环境相似的观察笼中进行独立观察, 录像会记录实验期间的全部运动行为, 每天记录 20 min, 共收集 5 天数据。

1.3.2 威胁相关的焦虑与防御性行为实验 (TAD)

该实验主要检测实验对象对人类凝视的反应, 在进行实验时, 将实验对象从所生活的社群中单独分离出来, 转移入与日常生活环境相似的观察笼中, 先使实验对象在观察笼中自由活动 9 min 以适应环境 (适应期), 之后实验者在观察笼前 2 m 距离展示自己的侧面相 9 min (非注视期), 之后离开行为观察室 3 min (放松期), 最后在观察笼前 2 m 距离展示自己的正面并注视实验对象 9 min (注视期)。实验对象的所有行为及声音被设备记录以进行后续分析。

1.3.3 社交行为观察实验

1) 同社群内社交观察实验。将同一年龄段的实验对象组成 3 个社群, 每个社群包括 3 只野生型食蟹猴与 2 只转基因型食蟹猴, 3 个社群中的实验对象共同生活 6 个月后将开始本实验, 每天观察记录 1 h 各社群内的行为情况, 连续观察 5 d。在分析中, 实验对象之间明显的互动行为且时间超过 3 s, 则定义为社交行为。

2) 不同社群配对社交观察实验。该实验观察的是离开日常生活社群在隔离环境下与不同社群个体的社交行为。实验前将 3 个社群中的实验对象安排为两两一对的实验配对, 在每个配对中, 两个个体来自于不同的社群, 所有的配对可按照基因型划分为野生型与野生型配对、野生型与转基因型配对和转基因型与转基因型配对 3 种类别, 在行为观察笼中对所有的实验配对观察和记录 5 d 每天 1 h 的行为情况。分析时, 实验对象之间有互动行为且时间超过 3 s, 则定义为社交行为。

1.3.4 威斯康星通用仪器测试 (WGTA)

通过威斯康星通用仪器对实验对象进行学习能力的测试, 威斯康星通用仪器大体由测试盒、活动窗、带食槽的展示板所组成, 通过实验者布置展示板之后打开活动窗使实验对象做出选择而达成实验目的。第一阶段为黑白块实验, 首先训练实验对象能够在展示板上的食槽内得到食物, 之后使有食物的食槽与覆盖其上的黑块或者白块相偶联, 测试实验对象学会选择的时间, 之后将奖励与颜色反转, 测试实验对象学会反转的时间。第二阶段为汉密尔顿搜索, 该阶段首先允许实验对象在 4 个覆盖同样色块的食槽中寻找随机放置的食物, 之后将食物固定放置在选择最少的位置中, 测试实验对象的选择正确率。最后一阶段为学习实验, 在该阶段, 实验对象需要检测对于 240 对不同形状物体的辨别能力, 以此得到奖励。

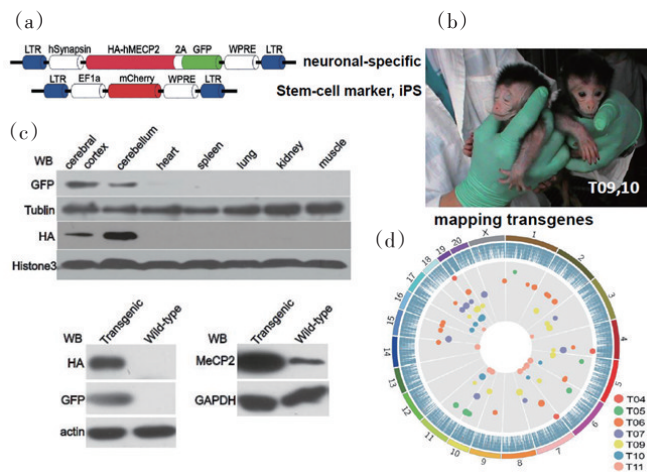
1.4 F1 代 MeCP2 转基因食蟹猴的建立

将 F0 代 MeCP2 转基因食蟹猴 T07 的睾丸组织移植入裸鼠体内, 使用激素从而得到成熟精子, 并使用体外受精和胚胎移植的方法得到 F1 代的 MeCP2 转基因食蟹猴, 使用该方法, 相对于自然繁衍能够大大缩短生殖周期。

2 结果与分析

2.1 MeCP2 转基因食蟹猴的建立和鉴定

在建立转基因动物时通过使用慢病毒载体侵染卵母细胞带入外源基因的方法^[23] (图 1(a)), 成功地建立了在神经系统中特异性过表达 MeCP2 基因的转基因食蟹猴模型 (图 1(b))。通过 Deep sequencing 和 Western Blot 检测, 外源转入的 MeCP2 基因有效地插入食蟹猴的基因组之中^[24-27] (图 1(d)), 并且该转入的外源基因能够特异性地只在神经系统中进行表达 (图 1(c))。

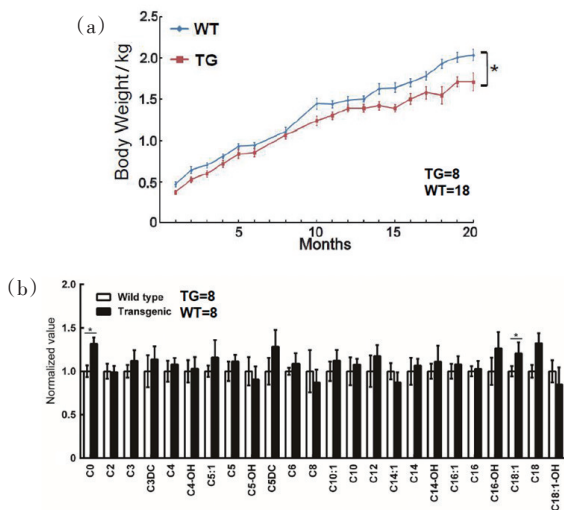


(a) 慢病毒转基因载体的设计示意; (b) 哺乳期的转基因食蟹猴T09与T10; (c) 对转基因食蟹猴外源基因表达的蛋白印迹检测, 结果显示转基因食蟹猴能够特异地在神经系统中表达外源MeCP2基因; (d) 通过深度测序绘制出的外源基因在食蟹猴全基因组中插入位点的分布图谱

图1 神经特异性表达MeCP2转基因食蟹猴动物模型的建立
Fig. 1 Establishment of neural specific expression MeCP2(gene) transgenic crab-eating monkey model

2.2 体征观察结果

在体征观察与记录中, MeCP2转基因食蟹猴表现出明显的体重增长迟缓(图2(a))以及血浆中总脂肪酸及C18脂肪酸水平的异常(图2(b)), 表明该转基因食蟹猴具有发育迟滞与脂肪酸代谢异常, 这2种表型也见



(a) 出生20月内的体重增长曲线, 转基因食蟹猴相对于野生型对照表现出明显的体重增长迟缓; (b) 血浆中游离脂肪酸的检测, 结果显示转基因食蟹猴血浆中总游离脂肪酸(CO)的水平相对于野生型对照有明显的差距

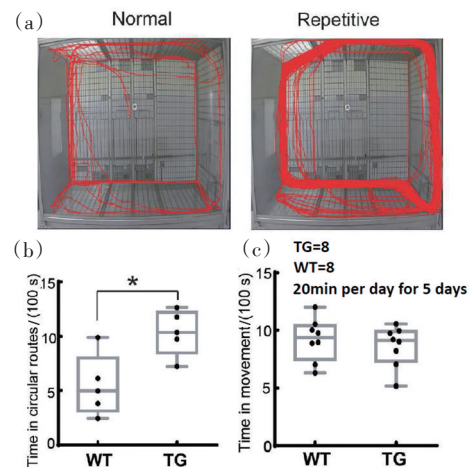
图2 MeCP2转基因食蟹猴的体征表征异常
Fig. 2 Abnormal signs of MeCP2(gene) transgenic crab-eating monkey

于对MeCP2重复综合症患者的临床表现的报道中^[28]。

2.3 行为学实验结果

2.3.1 独立观察实验结果

在独立观察实验中, 对单只食蟹猴的行动路线进行了追踪, 并每只实验个体的全行动路线以及其中的刻板性重复路径的时间进行了统计, 结果显示MeCP2转基因食蟹猴相对于野生型对照, 其总的运动时间没有显著差别, 即并没有运动能力的区别, 但转基因组会花费更多的时间在刻板的重复性路径行进上(图3)。



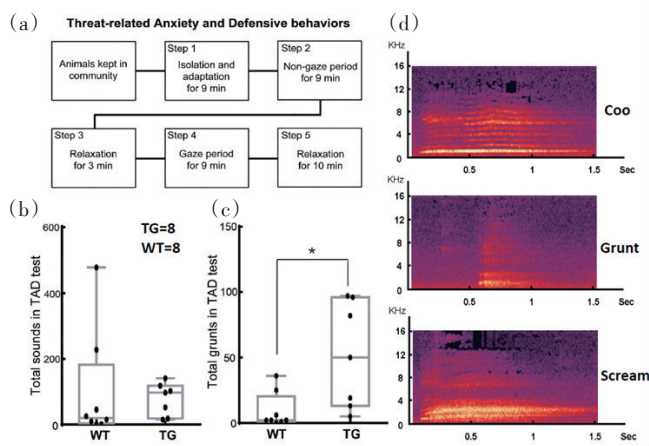
(a) 独立行为观察实验中进行行动路径追踪时出现的刻板性重复路径示意; (b) 刻板性重复路径的时间统计, 结果显示转基因食蟹猴显著高于野生型对照组; (c) 全行动时间统计, 转基因食蟹猴与野生型对照在行动能力上并没有显著区别

图3 MeCP2转基因食蟹猴在独立行为观察实验中表现出的行为异常

Fig. 3 Behavioral abnormalities of MeCP2(gene) transgenic monkeys in solo observation

2.3.2 威胁相关的焦虑与防御性行为实验(TAD)结果

在TAD实验中, 统计了整个实验实验个体的全部叫声, 并通过声谱对叫声进行了分类, 全部叫声可分为3类, 每种叫声类别代表不同的情感: 1 Coo: 代表交流意愿; 2 Grunt: 代表紧张与敌意; 3 Scream: 代表极端情绪。在TAD实验中, MeCP2转基因食蟹猴实验组相对于野生型对照组, 两组间的叫声总次数没有显著的差别, 但代表紧张与敌意的Grunt型叫声次数统计中, 转基因组明显高于野生型对照组。该结果表明当实验者人为地给予转基因食蟹猴威胁性刺激时, 相对于野生型对照, 该型食蟹猴会表现出更强烈的焦虑情绪与敌意(图4)。



(a) TAD实验流程示意; (b) 转基因食蟹猴在TAD实验中的总叫声次数与野生型对照并无显著差别; (c) 转基因食蟹猴在TAD实验中代表焦虑与敌意的Grunt叫声次数显著高于野生型对照; (d) TAD实验中出现的3种叫声的声谱(Coo:代表交流意愿; Grunt:代表紧张与敌意; Scream:代表极端情绪)

图4 威胁相关的焦虑与防御性行为观测(TAD)显示 *MeCP2*转基因食蟹猴相比于野生型对照, 在威胁压力前更容易被激起焦虑与敌意

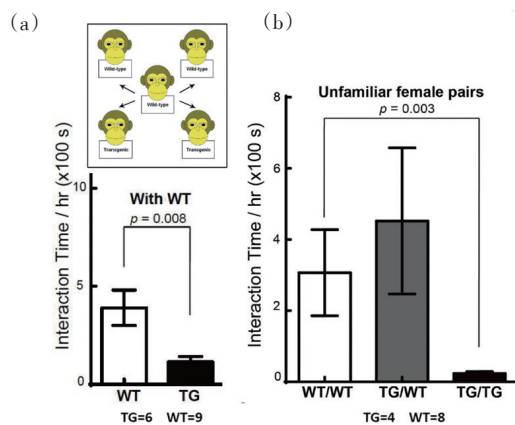
Fig. 4 Threat-related anxiety and defensive (TAD) behavioural test showed that *MeCP2*(gene) transgenic monkey was more likely to be provoked anxiety and hostility compared to wild-type control under threatening pressure

2.3.3 社交行为观察实验结果

在同社群内社交行为观察实验中, 通过对组建的3只野生型与2只转基因型5只猴的3个社群中, 每一只野生型在观察时段内的社交行为及其对象进行分类和时间统计(每只野生型相对应的社交对象为2只野生型与2只转基因型), 结果显示, 被观察的野生型食蟹猴与同社群转基因型的社交时间, 显著地低于该被观察对象与同社群中野生型的社交时间。

在不同社群配对社交行为观察实验中, 通过对野生型与野生型配对, 野生型与转基因型配对, 转基因型与转基因型配对, 3种配对组的社交时间进行统计, 其结果显示野生型与野生型配对组中的社交时间要显著高于转基因型与转基因型配对组的社交时间。

社交行为及能力的检测对于自闭症表型具有最为重要的意义, 在社交行为观察实验中, 研究人员发现, 无论是在社群内的社交行为还是与另一只配对的社交行为, 转基因食蟹猴的社交频率统计结果均显著地低于野生型对照(图5), 该结果对于评估 *MeCP2*转基因食蟹猴的类自闭症表型具有重要的意义。



(a) 社群内社交行为实验结果, 显示转基因食蟹猴社交时间相对于野生型对照的明显下降; (b) 配对社交行为实验结果, 显示转基因食蟹猴配对的社交时间相对于野生型配对的社交时间有明显的下降

图5 *MeCP2*转基因食蟹猴在社交行为实验中表征出的异常
Fig. 5 Abnormal activation of *MeCP2*(gene) transgenic crab-eating monkeys in social behavior observation

2.3.4 威斯康星通用仪器测试(WGTA)

WGTA通过黑白块实验、汉密尔顿搜索实验、学习实验3个阶段检测实验对象的学习能力, 在该项目中, 研究人员通过此项测试对转基因食蟹猴的学习能力进行了评估^[29-30], 在该项实验的3个阶段中, 转基因食蟹猴并没有表现出明显的学习障碍或是学习能力异常, 但却有3只实验对象在难度较高的学习实验阶段出现了无论对错只选同一侧的重复刻板性行为, 而作为对照的野生型对照组并未出现此种行为, 该行为被认为是自闭症的典型表征(图6)。

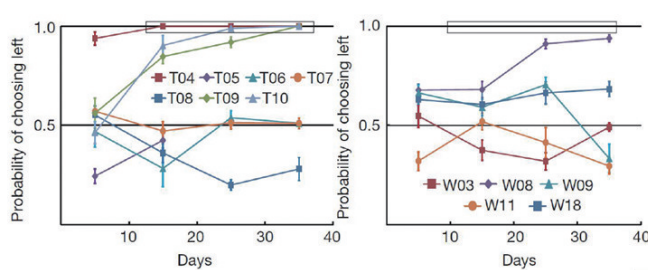


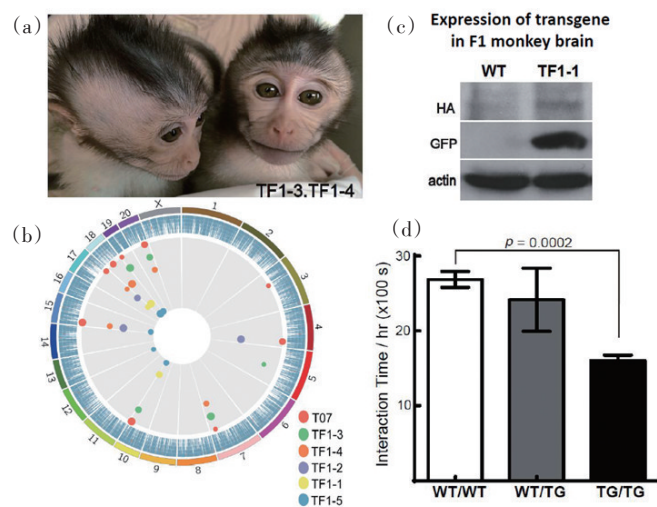
图6 WGTA实验中, *MeCP2*转基因食蟹猴表征出的重复刻板性行为, 即在做出选择时100%只选择一侧(如图中方框区域所示)

Fig. 6 In WGTA, *MeCP2*(gene) transgenic monkey represented the repeated stereotyped behavior that only choice of one side at the time of making choice (as shown in the box area)

2.4 F1代 *MeCP2*转基因食蟹猴的建立与鉴定及其在社交行为观察实验中的表现

在自闭症中, 遗传是一项重要因素, 而作为致病基

因已明确的 *MeCP2* 重复综合症, 遗传影响的重要性不言而喻。为深入研究此问题, 通过将转基因食蟹猴的精巢组织移植至裸鼠皮下并使用激素促进成熟, 在得到转基因食蟹猴的成熟精子后, 通过体外受精以及人工受孕技术, 成功地在短期内得到了原代转基因食蟹猴 (F0) 的子代猴 (F1) (图 7(a)、(c))^[31], 通过 Deep sequencing 检测及分析, 结果显示了外源 *MeCP2* 转基因片段在食蟹猴全基因组中的分布, F0 代 *MeCP2* 转基因食蟹猴基因组中的外源插入片段的位点, 通过种系传递, 遗传至 F1 代子猴的基因组中, 并且 F1 代子猴中位点的分布与 F0 代比较, 呈现出典型的孟德尔分离现象 (图 7(b))。同时, 通过 Western Blot 检测, F1 代转基因食蟹猴的大脑中也能够特异性地表达外源的 *MeCP2* 基因, 此结果显示, F1 子代猴从亲代 F0 身上遗传到了神经系统中特异性过表达 *MeCP2* 的特性。



(a) 哺乳期的转基因 F1 子代猴 TF1-3 与 TF1-4; (b) 深度测序绘制的转基因 F1 子代猴及其 F0 父本 (T07) 的外源基因插入位点图谱, 该图谱展现出 F1 代相对于 F0 代的典型的孟德尔分离现象; (c) 免疫印迹检测的结果显示 F1 子代依然表达外源基因; (d) 配对社交行为实验结果, 显示 F1 子代转基因食蟹猴配对的社交时间相对于野生型配对的社交时间有明显的下降

图 7 *MeCP2* 转基因食蟹猴 F1 子代的遗传学、生物化学以及行为学表征

Fig. 7 Genetic, biochemical and behavioral characterization of F1 offspring of *MeCP2*(gene) transgenic crab-eating monkey²

针对于 F1 代转基因食蟹猴进行了在不同社群配对社交行为观察实验中, 通过对野生型与野生型配对, 野生型与转基因型配对, 转基因型与转基因型配对, 三种配对组的社交时间进行统计, 其结果显示野生型与野

生型配对组中的社交时间要显著高于转基因型与转基因型配对组的社交时间。这一结果表明转基因食蟹猴相较于野生型对照也展现出社交行为频率的显著下降 (图 7(d)), 该表型与 F0 亲代猴以及自闭症患者的临床表型是相似的。

3 讨论与结论

在该项研究中, 仇子龙研究组与苏州灵长类平台成功地建立了神经系统特异性表达 *MeCP2* 的转基因食蟹猴模型, 且该转基因可以通过种系传递向子代进行遗传。并且, 无论是 F0 还是 F1 代, *MeCP2* 的异常表达都导致了转基因食蟹猴出现明显的类自闭症行为, 简而言之, 研究人员通过最新的遗传操作技术成功使得作为与人类亲缘关系很近的猴子患上了自闭症。

对于自闭症研究而言, 让猴子患上了自闭症, 可能只是遥遥征途中坚实的第一步, 后面依旧任重道远。目前, 针对 *MeCP2* 转基因食蟹猴的后续工作已经在进行中, 为更全面评估 *MeCP2* 转基因食蟹猴的表型特征, 更多与自闭症表型相关的行为学实验正在这一动物模型上进行; 针对转基因食蟹猴的全颅腔核磁共振成像也在紧锣密鼓进行中, 以期能够寻找到自闭症在脑核团结构及神经环路层面发生异常的证据。中国科学院神经科学研究所的科研人员们希望能够迅速推进对于自闭症的研究, 为早日彻底了解和克服自闭症贡献自己的力量。

近些年, 自闭症发病率逐年上升, 又因为自闭症多为儿童期发病, 起病早, 病程时间长, 患者自理能力因病被大幅减弱, 需要大量的日常看护与照顾, 一些严重的自闭症甚至可致患者未成年而夭折。自闭症的这些特点给众多儿童的身心健康造成了严重的威胁, 给众多的家庭带来了不幸和沉重的负担, 也提高了整个社会的看护与教育成本。而与此相对的是, 近几十年, 虽然生命科学与医学都有了长足的发展与进步, 然而, 自闭症因其发病以及临床表征的复杂性, 目前仍是神经科学及医学的研究热点之一, 其遗传背景、发病的细胞及组织机制、外界的相关刺激因素等众多核心问题并不明晰, 干预及治疗的手段和药物也比较有限。在这种情形下, 该项目中所建立的 *MeCP2* 转基因食蟹猴模型对于自闭症的基础研究以及临床治疗都具有非常重要的意义。首先, 从基础研究的方向而言, *MeCP2* 转基

因食蟹猴动物模型的建立,为之后进一步研究自闭症的机制提供了坚实的基础,有别于临床病例分析,通过此模型,能够更深入地在分子、细胞及组织等各微观层面上研究和了解自闭症的发病机制,进而研究和了解神经系统中突触及神经环路的功能架构方式及动态变化。之后,从医学临床应用的方向而言,自闭症因具有临床表征多样化的特点,相对于众多患者遗传背景和生活环境的复杂性及不可控,动物模型具有遗传背景清晰、成长环境规范化以及能够随时监测的优势,通过该疾病动物模型能排除众多的不可控因素,为观察自闭症的病程进展提供了一扇很好的窗口。并且,在建立该动物模型的同时,也同时确定了鉴定以及表型评估的标准,新的治疗方法及药物均可以在该转基因食蟹猴上进行测试,且对治疗效果的评定非常明确,因此,该项工作也为自闭症的临床治疗提供了良好的动物模型和试验平台。

参考文献(References)

- [1] Eisenberg L. Child psychiatry. Mental deficiency[J]. *American Journal of Psychiatry*, 1949, 120(114): 526–528.
- [2] Caronna E B, Milunsky J M, Tagerflusberg H. Autism spectrum disorders: Clinical and research frontiers[J]. *Archives of Disease in Childhood*, 2008, 93(6): 518–523.
- [3] Rapin I, Tuchman R F. Autism: Definition, neurobiology, screening, diagnosis[J]. *Pediatric Clinics of North America*, 2008, 55(5): 1129–1146.
- [4] Noens I, Van B I, Verpoorten R, et al. The ComFor: An instrument for the indication of augmentative communication in people with autism and intellectual disability[J]. *Journal of Intellectual Disability Research*, 2006, 50(9): 621–632.
- [5] Lam K S L, Aman M G. The repetitive behavior scale–revised: Independent validation in individuals with autism spectrum disorders[J]. *Journal of Autism & Developmental Disorders*, 2007, 37(5): 855–866.
- [6] Delorme R, Ey E, Toro R, et al. Progress toward treatments for synaptic defects in autism[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(6): 685–694.
- [7] Azevedo F, Carvalho L L, Farfel J, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled–up primate brain[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2009, 513(5): 532–541.
- [8] Herculano–Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled–up primate brain and its associated cost [J]. *PNAS*, 2012, 109(Suppl 1): 10661–10668.
- [9] Suzana H H. The human brain in numbers: A linearly scaled–up primate brain[J]. *Frontiers in Human Neuroscience*, 2009, 3(31): 31.
- [10] Gray E G. Axo–somatic and axo–dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron microscope study[J]. *Journal of Anatomy*, 1959, 93(4): 420–433.
- [11] Chang H T. Cortical neurons with particular reference to the apical dendrites[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1952, 17(7): 189–202.
- [12] Yuste R. Electrical compartmentalization in dendritic spines [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2013, 36(1): 429–449.
- [13] Sheng M, Kim E. The Postsynaptic organization of synapses [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3(12): VII.
- [14] Delorme R, Ey E, Toro R, et al. Progress toward treatments for synaptic defects in autism[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(6): 685–694.
- [15] Meehan R R, Lewis J D, McKay S, et al. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs[J]. *Cell*, 1989, 58(3): 499–507.
- [16] Nan X, Campoy F J, Bird A A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin[J]. *Cell*, 1997, 88(4): 471–481.
- [17] Young J I, Hong E P, Castle J C, et al. Regulation of RNA splicing by the methylation–dependent transcriptional repressor methyl–CpG binding protein 2[J]. *PNAS*, 2005, 102(49): 17551–17558.
- [18] Cheng T L, Wang Z, Liao Q, et al. MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex[J]. *Developmental Cell*, 2014, 28(5): 547–560.
- [19] Amir R E, Ib V D V, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X–linked MECP2, encoding methyl–CpG–binding protein 2[J]. *Nature Genetics*, 1999, 23(2): 185–188.
- [20] Ramocki M B, Peters S U, Tavyev Y J, et al. Autism and other neuropsychiatric symptoms are prevalent in individuals with MECP2 duplication syndrome[J]. *Annals of Neurology*, 2009, 66(6): 771–782.
- [21] Samaco R C, Mandel–Brehm C, McGraw C M, et al. Crh and Oprm1 mediate anxiety–related behavior and social approach in a mouse model of MECP2 duplication syndrome[J]. *Nature Genetics*, 2012, 44: 206–211.
- [22] Collins A L, Levenson J M, Vilaythong A P, et al. Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice[J]. *Human Molecular Genetics*, 2004, 13(21): 2679–89.
- [23] Nakagawa T, Feliu–Mojer M I, Wulf P, et al. Generation of

- lentiviral transgenic rats expressing Glutamate Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1) in brain, spinal cord and testis[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2006, 152(1/2): 1-9.
- [24] Janovitz T, Klein I A, Oliveira T, et al. High-throughput sequencing reveals principles of adeno-associated virus serotype 2 integration[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(15): 855-8568.
- [25] Cohn L B, Silva I T, Oliveira T Y, et al. HIV-1 integration landscape during latent and active infection[J]. *Cell*, 2015, 160(3): 420-432.
- [26] Xiao J, Zhang L, Wang J, et al. Rearrangement structure-independent strategy of CNV breakpoint analysis[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(5): 755-763.
- [27] Du R, Lu C, Jiang Z, et al. Efficient typing of copy number variations in a segmental duplication-mediated rearrangement hotspot using multiplex competitive amplification[J]. *Journal of Human Genetics*, 2012, 57(8): 545-551.
- [28] Frye R E, Melnyk S, Macfabe D F. Unique acyl-carnitine profiles are potential biomarkers for acquired mitochondrial disease in autism spectrum disorder[J]. *Translational Psychiatry*, 2013, 3(1): e220.
- [29] Harlow H F. The development of learning in the Rhesus monkey[J]. *American Scientist*, 1959, 47(4): 354A-479.
- [30] Ha J C, Mandell D J, Gray J. Two-item discrimination and Hamilton search learning in infant pigtailed macaque monkeys [J]. *Behavioural Processes*, 2011, 86(1): 1-6.
- [31] Liu Z, Nie Y H, Zhang C C, et al. Generation of macaques with sperm derived from juvenile monkey testicular xenografts [J]. *Cell Research*, 2015, 26(1): 139-142.

Autistic-like behaviors by *MECP2* transgenic monkeys and germline transmission

QIU Zilong, LI Xiao

State Key Laboratory of Neuroscience, Institute of Neuroscience, Chinese Academy of Sciences, CAS Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (CEBSIT), Shanghai 200031, China

Abstract Autism is a neurological disease with high public concern in recent years. Methyl-CpG binding protein 2 (*MeCP2*) plays an important role in autism for its importance in transcriptional regulation and microRNA processing. Mutations in *MeCP2* gene are found in most of patients with Rett syndrome, duplications of *MeCP2*-containing genomic segments cause the *MeCP2* duplication syndrome, which shares core symptoms with autism spectrum disorders. Although *MeCP2* transgenic mice has already been reconstructed, it is still difficult to identify autism-like behaviours in the mouse model of *MeCP2* overexpression. In this article we report the lentivirus-based transgenic cynomolgus monkeys expressing human *MeCP2* in the brain. Genomic integration sites of the transgenes are characterized by a deep-sequencing-based method and expression of the *MeCP2* transgene is confirmed by Western blotting. This type of transgenic monkeys exhibits autism-like behaviours in action, social and emotional aspects and shows germline transmission of the transgene. These results indicate the feasibility and reliability of using genetically engineered non-human primates to study brain disorders.

Keywords autism; *MeCP2* transgenic; abnormal social behavior; germline transmission ●



(责任编辑 田恬)