

从克隆猴到嵌合猴 灵长类模型还有多远?

“在我看来,此次嵌合猴成果对生命医学的重要性不亚于克隆猴,是非人灵长类实验动物模型制作的一个里程碑。”

胚胎干细胞可以体外无限自我复制,对于制作携带疾病基因的非人灵长类实验动物模型来说,胚胎干细胞嵌合体技术有着其独特的优势

“我们的目标是尽快做出几种脑疾病的猴模型,争取在5年内向世界证实猴模型对医药研发有用。”

“已经有一些跨国公司联系到我们,希望以后在上海建立医药CRO公司,我们做出来猴模型可以给他们应用,这是一个未来产业。”



嵌合猴

嵌合猴是个大台阶

“实验动物是生命医学的基础。鼠类实验动物模型之所以对生命医学作出巨大贡献,关键在于制作出了带有特定疾病基因的小鼠品系。”此次研究的主角是猴,但蒲慕明从一只获得诺贝尔奖的小鼠讲起。

小鼠品系,是经过长期繁殖和选择得到,同一品系的小鼠在遗传特征和生理特性上高度一致,做药物实验时互为对照,便于排除干扰因素。

那么,带有特定疾病基因的小鼠品系是怎么做出来的呢?

如果对一批小鼠的受精卵进行基因打靶,改变基因组中特定基因或者序列,由于打靶程度和靶点不完全相同,各个受精卵的基因也不同,并不能得到相同的疾病鼠。

蒲慕明介绍,美国分子遗传学家马里奥·卡佩奇想到,可以把小鼠A和小鼠B的受精卵在体外发育到囊胚期。囊胚期是指卵子刚刚受精但尚未种植到子宫的阶段,它由尚未分化的外胚层和内细胞团组成,外胚层未来会分化为胎盘,内细胞团则将分化为胎儿个体,具有发育全能性。

首先,对来自A的囊胚,马里奥·卡佩奇团队首先把其中的内细胞团里的细胞提取出来建成胚胎干细胞系,通过基因打靶改变其特定基因。筛选出其中打靶准确的细胞大量扩增,从而得到一批完全相同的、基因改变的胚胎干细胞。

第二,把这些来自A的胚胎干细胞注射到B的囊胚内细胞团中,这样就形成了一个嵌合胚胎,其内细胞团既有来自A的,也有来自B的。

第三,将嵌合胚胎植入小鼠C体内孕育,最终诞生嵌合小鼠。小鼠C并不对嵌合产生影响,只起到代孕作用。

“最关键的是嵌合体中两种细胞的比例,供体细胞占比要足够大才能改变嵌合动物,这一点在鼠上做成了。”蒲慕明说。

胚胎干细胞嵌合技术1984年在小鼠上诞生后,迅速成为帮助科学家确认单个基因在人类健康和疾病中作用的一大利器,带来生命医学界的重大革命,对这项技术作出重要贡献的三位科学家马里奥·卡佩奇、马丁·埃文斯、奥利弗·史密斯因此在2007年获得诺贝尔生理学或医学奖。2008年,科学家在大鼠上也实现了胚胎干细胞嵌合。

遗憾的是,胚胎干细胞嵌合技术在灵长类上的研究进展十分缓慢。

慢。由于啮齿类与灵长类存在巨大差异,一些人类疾病并不能在啮齿类实验动物上实现。猴作为与人类亲缘最近的动物,被视为实验动物模型的最佳选择,但尚未有技术能制作出猴品系,实验猴的成熟应用仅限于药物安全实验。

2012年,美国的灵长类实验室曾得出实验结论:猴的胚胎干细胞不能形成嵌合体。之后几年,中国科学院院士、昆明理工大学季维智团队取得重要进展,他们通过研究得到过流产或出生的胚胎干细胞嵌合猴,嵌合比例为0.1%~4.5%。

现在,世界首只胚胎干细胞高比例嵌合猴诞生,向世界证实了猴模型的可能性。2023年11月9日,《细胞》以封面文章形式发表题为《高比例胚胎干细胞贡献的出生存活嵌合猴》的研究成果,由中国科学院脑智卓越中心、上海脑科学与类脑研究中心刘真研究组,中国科学院脑智卓越中心非人灵长类研究平台孙强研究团队和中国科学院广州生物医药与健康研究院 Miguel A. Esteban(米格尔·埃斯特班)研究组合作完成,获得了科技部、中国科学院、上海市、自然科学基金委的资助。

审稿人评价,该研究结果是非凡的,因为提供了强大的证据证实灵长类胚胎干细胞可以产生高比例的嵌合动物,这在之前没有得到明确证实。

解决三大难题,嵌合程度高达70%

记者采访了解到,团队为40只代孕母猴移植了有明显嵌合的囊胚,共获得4只流产的胚胎和6只出生的小猴。检测发现,其中1只流产胚胎和1只出生小猴有明显嵌合,前者的胚胎干细胞贡献比例约20%,后者的胚胎干细胞贡献比例高达70%。

团队进一步检测发现,供体胚胎干细胞可以跟受体胚胎细胞同步分化到猴的各种细胞谱系中。其中,脑细胞的嵌合程度最高,达到90%。“这意味着这项技术对于脑疾病的研究潜力巨大。”蒲慕明说。

“不仅如此,嵌合猴的胎盘组织和生殖细胞中也有胚胎干细胞的高比例贡献。”刘真说,胎盘组织和生殖细胞在胚胎发育和重编程过程中非常特殊。其中,胎盘组织由外胚层发育而来,小鼠胚胎干细胞几乎不会贡献到胎盘组织,灵长类胚胎干细胞可能具有不同于啮齿类的独特的发育全能性特征。

生殖细胞发育过程中要经历更加剧烈的表观重编程,生殖细胞的高比例贡献表明供体基因可以传递给下一代,这对后续基于该技术的遗传修饰实验猴模型构建至关重要。

世界首只胚胎干细胞高比例嵌合猴为什么能成功诞生?刘真及团队告诉记者,主要是在前人研究的基础上解决了三个难题:

一是获得有高效发育潜能的猴胚胎干细胞。小鼠的胚胎干细胞有幼稚态和始发态两种形态,其中幼稚态的发育全能性更强。但常规培养的灵长类胚胎干细胞与小鼠胚胎干细胞的始发态更接近,一定程度上表明,灵长类胚胎干细胞的发育全能性天然更弱。

“培养液是关键。”刘真介绍,团队广泛研究各类用于干细胞的培养液后,建立了处于6种不同培养体系下的食蟹猴胚胎干细胞,发现5iLAF、4CL和iPXGL培养体系下的干细胞具有较高的多能性,而且4CL培养体系下的干细胞具有更好的传代稳定性和基因组稳定性。

二是解决胚胎干细胞注入后快速凋亡的问题。由于胚胎发育条件和干细胞培养条件不同,团队需要避免胚胎干细胞注入受体胚胎后快速凋亡。

中国科学院脑智卓越中心联合培养博士曹静介绍,团队选用4CL培养液下的胚胎干细胞进行猴胚胎注射实验,通过测试不同培养液和培养时间的组合,发现4CL培养液与胚胎培养液1:1混合可以得到最适合嵌合胚胎的培养条件。

三是严谨准确地检测出嵌合比例。为了追踪胚胎干细胞,按照领域内常用的方法,团队早在胚胎干细胞植入胚胎前就将其标记上了绿色荧光蛋白,由胚胎干细胞分化而来的细胞会表现出荧光。

除此之外,团队建立了包含PCR扩增(聚合酶链式反应)、微卫星亲子鉴定、基因组单核苷酸多态性深度测序、流式细胞仪检测、绿色荧光蛋白检测、免疫荧光检测的一系列严格的嵌合体分析流程。刘真举例说,小猴出生后,团队首先用微卫星亲子鉴定(类似人的亲子鉴定)来确定嵌合猴确实携带来自胚胎干细胞的信息,随后用基因组单核苷酸多态性深度测序解析嵌合猴的基因组信息,从而区分胚胎干细胞和原本胚胎细胞的比例。

此项研究严格遵守生物伦理规范,所有实验均符合国际干细胞研究学会的研究指南,并经过中国科学院脑智卓越中心伦理委员会审核。

规模化应用很快到来

鼠类模型有很多优势,比如繁殖快、体积小、很多基因编辑的方法也很成熟,但其与人类的区别较大。以脑疾病研究为例,鼠脑没有人脑那样的沟回和脑区,很难用鼠类模型模拟神经系统疾病,包括但不限于孤独症、老年痴呆症、帕金森症等。如果能用猴制作出成熟的疾病模型,那么当下的许多疑难杂症研究治疗有可能出现转机。

蒲慕明介绍,针对不同疾病,有不同的模型制作方法。2018年,中国科学院脑智卓越中心制作出了世界首个体细胞克隆猴,次年利用该技术制作出了5只脑疾病体细胞克隆猴,目前正与中国科学院上海药物研究所合作开发治疗脑疾病创新药。2016年国际上第一个用转基因技术做出来的孤独症猴也出自这个研究团队。

“现在我们开发了七八种不同的猴模型,但这些模型不是最好的,因为每只猴的个体差异太大。胚胎干细胞嵌合技术有望得到没有个体差异的疾病猴,从而推动猴模型走向规模化应用。”蒲慕明说。

从技术突破到真正建立疾病猴模型,需要多长时间?

猴模型的制作比鼠模型困难很多。仅从时间周期来看,小鼠20天出生,2个月性成熟,既可以传代也可以用于研究。猴怀孕需要5个半月,性成熟则需要5年甚至更久。

猴模型的制作除了研发和构建模型技术外,还需要针对猴模型重新建立饲养空间、行为范式、测试体系等。

刘真介绍,下一步将对胚胎干细胞进行基因打靶,也就是让猴携带上特定的疾病基因,这是制造疾病猴模型的关键一步。此次成果证实了胚胎干细胞高比例嵌合猴能做出,即理论上基因打靶后再按照现在这个嵌合步骤就能做出疾病猴模型,但实际能不能、会遇到什么问题还需要实践去验证。此外,中心有其他团队关注相关的表型分析、疾病测试、药物干预和认知研究。

“我们的目标是尽快做出几种脑疾病的猴模型,争取在5年内做出一些创新药来,向世界证实猴模型对医药研发有用。”蒲慕明告诉记者,届时,基础研究团队的成果将向下游推广,凭借猴模型上的独家优势吸引全球资源,“已经有一些跨国公司联系到我们,希望以后在上海建立医药CRO(医药研发外包)公司,我们做出来猴模型可以给他们应用,这是一个未来的产业。”

据《瞭望》

2018年1月25日,克隆猴“中中”和“华华”以封面文章形式登上国际学术期刊《细胞》,标志着体细胞克隆技术首次在灵长类动物上实现。

五年后,由中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(以下简称脑智卓越中心)牵头的研究再次登上《细胞》封面,这一次,他们带来了“嵌合猴”。

这是世界上首个用胚胎干细胞构建的高比例嵌合猴。团队将A猴的胚胎干细胞注射到B猴的胚胎内细胞团中,再将嵌合胚胎植入C猴体内代孕,最终诞生的小猴由A猴胚胎干细胞和B猴胚胎细胞共同分化而来,供体胚胎干细胞的占比高达70%左右。

“在我看来,此次嵌合猴成果对生命医学的重要性不亚于克隆猴,是非人灵长类实验动物模型制作的一个里程碑。”中国科学院院士、中国科学院脑智卓越中心学术主任蒲慕明接受《瞭望》新闻周刊记者采访时表示,胚胎干细胞可以体外无限自我复制,对于制作携带疾病基因的非人灵长类实验动物模型来说,胚胎干细胞嵌合体技术有着其独特的优势。