

- duced by advanced glycation end products and involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:6050874.
- [21] ZHAO P, LI XQ, LI Y, et al. Mechanism of miR-365 in regulating BDNF-TrkB signal axis of HFD/STZ induced diabetic nephropathy fibrosis and renal function[J]. Int Urol Nephrol, 2021, 53(10):2177-2187.
- [22] FANG X, HU X, ZHENG Z, et al. Smad interacting protein 1 influences transforming growth factor- β /Smad signaling in extracellular matrix protein production and hypertrophic scar formation[J]. J Mol Histol, 2019, 50(6):503-514.
- [23] GAO C, WANG B Y, CHEN Q, et al. Serum exosomes from diabetic kidney disease patients promote pyroptosis
- 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.02.035

- and oxidative stress through the miR-4449/HIC1 pathway[J]. Nutr Diabetes, 2021, 11(1):33.
- [24] 倡思聪, 杨伟, 罗鸿宇, 等. 血清微小 RNA-21 水平与糖尿病肾病患者氧化应激的相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(9):1786-1789.
- [25] 宋娜, 苏东峰, 高宇, 等. 糖尿病肾病患者血清 miR-21、CysC 与氧化应激指标的关系及其诊断价值[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(15):3643-3646.
- [26] CHEN B, LI Y H, LIU Y, et al. CircLRP6 regulates high glucose-induced proliferation, oxidative stress, ECM accumulation, and inflammation in mesangial cells[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11):21249-21259.

(收稿日期:2022-03-24 修回日期:2022-10-25)

CRISPR/Cas9 系统简介及其在疟原虫研究中的应用进展

崔金花 综述, 乔继琛[△] 审校

江西中医药高等专科学校, 江西抚州 344000

关键词: 成簇规律间隔短回文重复序列/Cas 关联蛋白 9 系统; 疟原虫; 基因编辑

中图法分类号: S852.7

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)02-0279-04

成簇规律间隔短回文重复序列/Cas 关联蛋白 9 (CRISPR/Cas9) 系统改造的基因编辑技术是继锌指核酸酶基因编辑技术和类转录激活因子效应物编辑技术后迅速发展起来的第 3 代基因编辑技术^[1]。CRISPR/Cas9 系统具有操作设计简单, 突变效率高, 成本低廉等优点, 迅速超越以往技术, 成为当前最热门的定点基因编辑工具。CRISPR/Cas9 基因编辑技术已经在多种动植物细胞中成功应用, 包括哺乳动物类甚至人类的细胞。目前已经报道在弓形虫、疟原虫、隐孢子虫、新杆状线虫、克氏锥虫、利什曼原虫等寄生虫领域均有应用。疟原虫是疟疾的病原体, 疟疾至今仍是全球面临的传染性疾病, 因此, CRISPR/Cas9 基因编辑技术被广泛应用于疟原虫的研究。CRISPR/Cas9 系统被《科学》杂志评为 2013 年度最重要的科学突破之一, JENNIFER 和 EMMANUELLE 2 位技术先驱共同获得了 2020 年诺贝尔化学奖的殊荣^[2]。本文阐述了 CRISPR/Cas9 系统的发现、分类、作用机制等, 重点分析在疟原虫研究领域的应用, 希望能够为疟原虫的基因修饰及其预防治疗提供参考。

1 CRISPR/Cas9 系统简介

1.1 CRISPR/Cas9 系统的发现 最早在 1987 年, CRISPR 由日本科学家在大肠埃希菌中发现, 随后在其他一些细菌的研究中这种类似基因结构也被陆续报道^[3]。2002 年, JANSSEN 等^[4]将 CRISPR 序列正式命名为 CRISPR, 基因编码的各类蛋白质统称为

CRISPR 附属蛋白(Cas 蛋白)。2005 年, 3 个研究小组同时发现了 CRISPR 序列中的间隔序列与宿主菌的染色体外遗传物质具有高度同源性^[5-7], 推测其功能可能与细菌抵抗外源遗传物质入侵有关^[6]。MAR-RAFFINI 等^[8]在研究中发现, 在细菌中 CRISPR 系统具有对抗噬菌体入侵, 阻止外源质粒转移的作用, 并验证了 CRISPR 系统的功能。2011 年, DELTCHEVA 等^[9]揭示了 CRISPR/Cas9 系统的分子机制。2013 年, CONG 等^[10]报道了 CRISPR/Cas9 系统可高效编辑基因组, 实现了对小鼠细胞部分基因及人类细胞基因编辑, 标志着 CRISPR/Cas9 系统又一次革命性的飞跃, 开启了基因编辑的新纪元。

1.2 CRISPR/Cas9 系统的分类 CRISPR 系统共分为 I 型、II 型和 III 型 3 种类型^[11]。3 种类型均可以切割抵抗外源 DNA 入侵, 均由 Cas 蛋白发挥切割作用, 目前仅有 II 型系统被开发利用, I 型系统中的 Cas 蛋白既复杂又多, III 型次之。CRISPR 系统在发挥作用的过程中大概分为获得适应、转录表达、干扰切割 3 个阶段。在 I 型和 II 型 CRISPR 系统中均有原间隔相关基序即 PAM 区。在适应阶段识别外源 DNA 原间隔的时候, PAM 区起重要作用。III 型 CRISPR 系统特有 Cas10 蛋白, 主要作用是参与 CRISPR RNA (crRNA) 成熟、切割外源入侵的 DNA^[12]。II 型是 CRISPR 系统中最简单的一类, 仅包含 4 个 Cas 蛋白基因(Cas9、Cas1、Cas2、Cas4), 其中 Cas9 是最具特色

[△] 通信作者, E-mail: qiaojc1990@sina.com。

的蛋白。Cas9 蛋白相对分子质量较大,其作用与 Cas10 蛋白类似,既可以加工促进 crRNA 前体(pre-crRNA)成熟,又可以切割降解外源 DNA^[13]。在Ⅱ型 CRISPR 系统中,由 Cas9 核酸酶、crRNA、反式激活的 crRNA(tracrRNA)、核糖核酸酶Ⅲ(RNaseⅢ)4 种成分一起即可发挥作用,在此系统中,先由 CRISPR 序列的基因转录生成 pre-crRNA,然后 tracrRNA、tracrRNA 与 pre-crRNA 的重复序列匹配;pre-crRNA 会在 RNaseⅢ 及 Cas9 蛋白等作用下形成成熟的 crRNA。crRNA-tracrRNA 结构会与 Cas9 核酸酶一起形成一个复合体,介导 Cas9 蛋白对与间隔序列匹配的 DNA 序列进行切割^[14]。

1.3 CRISPR/Cas9 系统的作用原理及应用 2012 年,JENNIFER 和 EMMANUELLE 2 位科研技术先驱以化脓性链球菌作为基础进行研究发现,其Ⅱ型 CRISPR 系统在发挥作用的过程中,成熟后的 crRNA-tracrRNA 可以指引 Cas9 核酸酶在目的基因发挥作用引起 DNA 双链断裂^[15]。如果将 crRNA-tracrRNA 人工融合成一条单向向导的 RNA,包含与目的 DNA 互补的 20 个碱基以上序列及与 Cas9 结合所需的二级结构序列,这段 RNA 序列依旧可以介导 Cas9 核酸酶寻找靶基因进行切割。后来,这段人工合成的 RNA 序列就是通常所说的向导 RNA(sgRNA),这一研究成果让细菌的天然免疫系统变成了一种基因修饰工具。

近年来,CRISPR/Cas9 系统已经广泛应用于细菌、酵母、番茄、拟南芥、大米、小麦、高粱、青蛙、果蝇、蚕、斑马鱼等物种的基因编辑中,以及哺乳动物类的鼠、兔,甚至成功用于人类细胞的基因编辑。CRISPR/Cas9 系统后来又被科研人员进行了多种改造,如 dCas9、RCas9、nCas9 等。dCas9 是将 Cas9 蛋白进行突变,使其内切酶活性丧失而不具备切割作用。dCas9 依旧保持在 gRNA 引导下与靶基因 DNA 序列结合的能力,特异性干扰转录延伸,阻碍 RNA 聚合酶结合或者是干扰转录因子结合,进而实现抑制基因的表达^[16]。RCas9 主要是针对 RNA 进行编辑和分析,nCas9 是针对 DNA 的单链进行切割,可以分别在 2 条单链进行特定的编辑改造,同时单链设计 sgRNA 还可以起降低脱靶率的效果^[17]。鉴于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的逐步成熟,该系统在寄生虫领域也被广泛应用,特别是在疟原虫研究中取得了较大进展。

2 CRISPR/CAS9 系统在疟原虫中的应用

疟疾每年大约引起 2.19 亿人感染,66 万人死亡,全球有 33 亿人受到疟疾的威胁。自 2017 年以来,我国已连续 5 年无疟疾本土病例发生,但输入性疟疾病例逐年增多,因此,我国面临的疟疾预防和控制压力依然很大。在全球范围内,形势最严峻的就是恶性疟原虫,而缺乏疫苗和药物抵抗是消除疟疾的主要障

碍。CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以帮助了解疟原虫基因的功能,为后续疫苗研究和抗疟药物筛选奠定基础。

2.1 人体疟原虫研究 感染人体的疟原虫有 5 种,其中对人体危害最大的就是恶性疟原虫,因此,CRISPR/Cas9 系统在恶性疟原虫的研究最为广泛。最早在人体疟原虫中使用 CRISPR/Cas9 系统的是法国的研究人员,率先尝试恶性疟原虫的基因敲除和基因定点编辑^[18]。在恶性疟原虫抗性株中,敲除了组氨酸丰富蛋白质编码 kahrp 基因和 egfp 基因,证明了 CRISPR/Cas9 系统可以在恶性疟原虫中工作,说明此系统是一种高效率的基因编辑工具。与此同时,WAGNER 等^[19]应用 CRISPR/Cas9 系统针对 kahrp 基因和 eba-175 基因进行敲除,实现高效率的基因中断可快速构建转基因的寄生虫,这是 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在疟原虫领域的最早尝试。

随后,CRISPR/Cas9 系统在疟原虫中的应用如雨后春笋般铺展开来。有研究者对 CRISPR/Cas9 系统的质粒进行改良,并成功用于恶性疟原虫的基因编辑,为后续连续基因操作和大基因敲除等研究奠定了坚实的基础^[20-21]。除了对基因进行敲除改造外,研究者还通过 CRISPR/Cas9 系统在恶性疟原虫基因组上融合 GFP 的基因片段,构建了会发出绿色荧光的新虫株^[22]。有研究显示,通过 CRISPR/Cas9 系统对疟原虫基因编辑可以制造新的耐药位点,为研究疟原虫耐药性提供了参考^[23-24]。还有研究者利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对恶性疟原虫的基因组进行改造,添加了 STK 等多段序列,为后续疟原虫抗体研究奠定了基础^[25]。好的 sgRNA 是基因编辑的关键,如果引导 RNA 不合适就不可能正确完成基因编辑,2018 年全球基因数据库问世,为后续快速优质选择 sgRNA 提供了参考^[26]。这些研究成果对进行疟原虫基础医学方面的研究,以及临床预防和治疗均有较高的参考价值。

2.2 鼠类疟原虫研究 鉴于疟疾的流行主要是通过按蚊在人群中传播,有科研工作者在亚洲斯氏按蚊进行人类疟疾受体的改造^[26]。应用 CRISPR/Cas9 系统插入 2 个基因,一个是抵抗恶性疟原虫的基因,另一个是标志基因。文献^[27]虽然没有直接利用 Cas9 对疟原虫进行基因改造,但是也为消除疟疾的目标做出了很大的帮助,展示了 CRISPR/Cas9 系统的强大性,同时也丰富了对寄生虫的研究思路。

由于恶性疟原虫的体外培养成本较高,加上对技术和实验室的硬性条件也有限制,进行大批量和广泛试验有一定难度。因此,鼠疟是利用小鼠模型来进行疟疾研究的最佳选择,国内厦门大学袁晶的团队运用 CRISPR/Cas9 系统对小鼠约氏疟原虫进行了基因修饰^[28]。后来,该团队又通过质粒改造成功对约氏疟原虫同时进行多个基因编辑,这大大加快了基因功能、

疟原虫发育情况和疟疾发病机制的研究^[29]。目前对于约氏疟原虫基因编辑成果显著,有研究者构建新的转基因虫株,有研究者制造新的突变位点,还有人尝试对约氏疟原虫 AP2 整个基因家族进行敲除,都极大地丰富了对 CRISPR/Cas9 基因编辑技术及疟原虫基因功能的认识^[30-31]。当然还有多个团队利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对于伯氏疟原虫进行基因编辑,充分展示了 CRISPR/Cas9 系统的实用性^[32-33]。目前,在国内已经有多个疟疾实验室均可以用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对疟原虫进行基因编辑,多篇硕士、博士毕业论文详细阐述了研究生使用 CRISPR/Cas9 系统对疟原虫基因编辑的实验过程^[34],这充分展示了 CRISPR/Cas9 系统强大的基因修饰能力和实用性。

3 CRISPR/Cas9 系统存在的不足与对策

目前来看,制约 CRISPR/Cas9 系统应用和发展的主要因素是脱靶效应。在设计 sgRNA 的时候,sgRNA 对目标基因处的序列进行匹配的同时,有些不完全与 sgRNA 匹配的序列也存在因错配引起被切割的风险,这就是 Cas9 允许错配导致的脱靶效应。因为 Cas9 允许严重的基因错配,使借助 sgRNA 的末端 NGG 处引发 DNA 序列切割,导致序列任意切割,严重损坏了基因组的完整性,使细胞、寄生虫的基因组发生不可预测的碱基序列突变、重排,甚至引起细胞死亡。因此,避免或者减少脱靶效应是很有必要的。科研工作者通过筛选 sgRNA 的特异性,针对目的基因序列的 2 条单链分别设计 sgRNA,以及改造 Cas9 序列来减少脱靶效应。有研究显示,通过串联 sgRNA 可以降低 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应风险^[35]。在疟原虫领域的应用,除了面临脱靶效应的风险外,还因疟原虫基因序列 A、T 碱基序列较多,为基因编辑带来诸多困难。目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术只是单纯的基因修饰和改造,对于基因功能分析有指导意义,还不能明确应用到临床预防和治疗方面,以及脱靶性不确定因素还需要继续研究。

4 展 望

自从 CRISPR/Cas9 系统被当作一种基因编辑工具从细菌的固有免疫系统中解放出来,到今天的广泛应用并取得飞速的进展,是一场基因编辑的革命,CRISPR/Cas9 基因编辑技术迅速超越并逐步淘汰了以往的基因编辑技术,为逐个基因的功能研究及大批量的基因筛选提供了有力支持,使各个领域的基因研究取得了丰硕的成果。CRISPR/Cas9 系统在疟原虫领域的应用,虽然已经取得了很大的成果,对明确基因功能、筛选抗药基因及发现其致病性等方面均提供了依据,但目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术还只是单纯的基因修饰和改造,而且面临着脱靶效应的问题,还不能明确应用到临床预防和治疗方面,还需要继续研究。况且 CRISPR/Cas9 基因编辑技术还面临

着伦理道德的讨论,虽有报道称其已经成功应用到临床器官移植方面的研究,但对于人类胚胎的基因编辑依然存在伦理道德与安全性的压力。期待随着 CRISPR/Cas9 系统的逐步改进,会更有利于对未知基因功能的研究,也期待 CRISPR/Cas9 基因编辑技术有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 徐景,杨光,江美祺,等. CRISPR/Cas9 技术在畜禽育种中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2022,49(4):1374-1383.
- [2] 谷思宇,杨晓梅,贺俊崎. CRISPR/Cas9 基因编辑技术:基因剪刀-重写生命密码的工具:2020 年诺贝尔化学奖简介[J]. 首都医科大学学报,2020,41(6):1014-1018.
- [3] MOJICA F J M, DIEZ-VILLASENOR C, SORIA E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria[J]. Mol Microbiol,2000,36(1):244-246.
- [4] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Mol Microbiol,2002,43(6):1565-1575.
- [5] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. Microbiology, 2005,151 (Pt 8):2551-2561.
- [6] POURCEL C, SALVIGNOL G, VERGNAUD G. CRISPR elements in yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. Microbiology, 2005,151 (Pt 3): 653-663.
- [7] MOJICA F J M, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. J Mol Evol,2005,60(2):174-182.
- [8] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA[J]. Science,2008,322(5909):1843-1845.
- [9] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature,2011,471(7340): 602-607.
- [10] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science,2013, 339(6121):819-823.
- [11] DEMIRCI Y, ZHANG B, UNVER T. CRISPR/Cas9: an RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing [J]. J Cell Physiol, 2018, 233 (3): 1844-1859.
- [12] BHAYA D, DAVISON M, BARRANGOU R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small rnas for adaptive defense and regulation[J]. Annu Rev Genet, 2011,45:273-297.
- [13] GENG S, SOHAIL H, CAO H, et al. An efficient root transformation system for CRISPR/Cas9-based analyses

of shoot-root communication in cucurbit crops[J]. Horticulture Res, 2022, 9; uhab082.

[14] 冯欢欢,单彩龙,李金月,等. CRISPR 系统中 Cas 蛋白的分类及作用机制[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 138(6):652-654.

[15] 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.

[16] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183.

[17] NELLES D A, FANG M Y, O'CONNELL M R, et al. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9[J]. Cell, 2016, 165(2):488-496.

[18] GHORBAL M, GORMAN M, MACPHERSON C R, et al. Genome editing in the human malaria parasite Plasmodium falciparum using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(8):819-821.

[19] WAGNER J C, PLATT R J, GOLDFLESS S J, et al. Efficient CRISPR/Cas9 mediated genome editing in P. falciparum[J]. Nat Methods, 2014, 11(9):915-918.

[20] LU J, TONG Y, PAN J, et al. A redesigned CRISPR/Cas9 system for marker-free genome editing in Plasmodium falciparum[J]. Parasit Vectors, 2016, 9:198.

[21] CRAWFORD E D, QUAN J, HORST J A, et al. Plasmid-free CRISPR/Cas9 genome editing in Plasmodium falciparum confirms mutations conferring resistance to the dihydroisoquinolone clinical candidate SJ733 [J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0178163.

[22] MOGOLLON C M, FIONA J A, IMAI T, et al. Rapid generation of marker-free P. falciparum fluorescent reporter lines using modified CRISPR/Cas9 constructs and selection protocol [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168362.

[23] KUDYBA H M, COBB D W, FLORENTIN A, et al. CRISPR/Cas9 gene editing to make conditional mutants of human malaria parasite P. falciparum[J]. J Vis Exp, 2018, 139:57747.

[24] NG C L, FIDOCK D A. Plasmodium falciparum in vitro drug resistance selections and gene editing[J]. Methods Mol Biol, 2019, 2013:123-140.

[25] KUANG D X, QIAO J C, LI Z, et al. Tagging to endogenous genes of Plasmodium falciparum using CRISPR/Cas9[J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1):595.

[26] RIBEIRO J M, GARRIGA M, POTCHEN N, et al. Guide RNA selection for CRISPR-Cas9 transfections in Plasmodium falciparum[J]. Int J Parasitol, 2018, 48(11): 825-832.

[27] GANTZ V M, JASINSKIENE N, TATARENKOVA O, et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(49):E6736-43.

[28] ZHANG C, GAO H, YANG Z K, et al. CRISPR/Cas9 mediated sequential editing of genes critical for ookinete motility in Plasmodium yoelii [J]. Molecular Biochem Parasitol, 2017, 212:1-8.

[29] XU R X, LIU Y J, FAN R X, et al. Generation and functional characterisation of Plasmodium yoelii csp deletion mutants using a microhomology-based CRISPR/Cas9 method[J]. Int J Parasitol, 2019, 49(9):705-714.

[30] QIAN P G, WANG X, YANG Z K, et al. A Cas9 transgenic Plasmodium yoelii parasite for efficient gene editing [J]. Mol Biochem Parasitol, 2018, 222:21-28.

[31] SHINZAWA N, NISHI T, HIYOSHI F, et al. Improvement of CRISPR/Cas9 system by transfecting Cas9-expressing Plasmodium berghei with linear donor template [J]. Commun Biol, 2020, 3(1):426.

[32] 杜靖. 基于 CRISPR/CAS9 系统的伯氏疟原虫基因组修饰技术的研究[D]. 北京:中国人民解放军军事科学院, 2019.

[33] 钱鹏戈. 约氏疟原虫 Cas9 转基因虫株的构建和应用[D]. 厦门:厦门大学, 2019.

[34] 刘惠. 恶性疟原虫肌动蛋白相关蛋白(Arps)基因修饰与功能研究[D]. 蚌埠:蚌埠医学院, 2020.

[35] 孟令文, 赵月蒙, 夏惠, 等. 利用 sgRNA 串联表达框架编辑恶性疟原虫 K13 和 NUP116 基因的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(3):197-201.

(收稿日期:2022-03-10 修回日期:2022-10-08)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.02.036

生活方式对促甲状腺激素和甲状腺激素水平的影响

李自生 综述, 陈 博 审校

安徽医科大学附属巢湖医院核医学科, 安徽合肥 238000

关键词: 甲状腺激素; 促甲状腺激素; 生活方式; 吸烟; 体质量指数

中图法分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)02-0282-04

甲状腺激素在机体正常发育和代谢中起至关重要的作用。甲状腺激素的合成受下丘脑-垂体-甲状腺

轴(HPT)介导反馈机制的调节。甲状腺激素水平降低会导致下丘脑促甲状腺素释放激素(TRH)合成增