



李劲松, 博士, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原生物化学与细胞生物学研究所)研究员, 从事干细胞与胚胎发育相关研究。率领团队建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“类精子干细胞”), 证明其能代替精子使卵子受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用类精子干细胞携带CRISPR/Cas9文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 提出并推动基于类精子干细胞技术的基因组标签计划。相关研究成果于2011年和2012年入选“中国科学十大进展”。以第一作者或通信作者身份在*Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Nature Cell Biology*等杂志发表60余篇研究论文。荣获中国科学院“百人计划”、国家杰出青年科学基金、中青年科技创新领军人才、国家百千万人才工程、中组部万人计划。

丁一夫, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原生物化学与细胞生物学研究所)李劲松研究组助理研究员, 主要从事以类精子胚胎干细胞为工具的人类复杂疾病的动物模拟研究, 参与科技部、国家自然科学基金委员会、上海市科委的多个科研项目, 以(并列)第一作者在*Cell Research*、*Nature Cell Biology*、*Methods in Molecular Biology*、*Science China-Life Science*等杂志上发表科研论文7篇。



复杂疾病小鼠模型构建新策略: 类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术

赖梭梅^{1,2}, 丁一夫¹, 李劲松¹

[1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所), 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; 2. 中国科学院大学, 北京 100039]

[摘要] 类精子单倍体胚胎干细胞是源自小鼠孤雄囊胚中的一种新型单倍体胚胎干细胞, 仅含有父源遗传物质, 性染色体为X染色体, 能在体外长期自我更新、增殖或诱导分化, 并可以利用CRISPR系统进行单基因或多基因的编辑, 能替代精子使卵母细胞受精。区别于原核注射、卵胞质内注射获得嵌合体或利用四倍体补偿技术等传统构建基因修饰小鼠模型的方法, 通过将基因编辑后的类精子单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞中, 可以高效稳定地一步获得基因型确定的半克隆小鼠, 不会存在嵌合现象, 原代小鼠即可用于研究。基于类精子单倍体胚胎干细胞获得的多基因精准编辑的复杂疾病小鼠模型, 可以在生物个体水平上阐述多个基因协同互作的效应, 从而更充分地模拟复杂的、可能受多个基因影响的人类疾病的各种病理特征, 以挖掘新的诊断和治疗方法。

[关键词] 单倍体; 类精子单倍体胚胎干细胞; CRISPR/Cas9; 小鼠疾病模型

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0369-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(32030029;31730062;31821004)

[作者简介] 赖梭梅(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 以类精子胚胎干细胞为工具的人类复杂疾病的动物模拟。

E-mail: laisuomei2020@sibcb.ac.cn

[通信作者] 李劲松(1971—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 利用类精子胚胎干细胞介导的半克隆技术进行生殖细胞发育及疾病模型研究。E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

丁一夫(1990—), 男, 理学学士, 助理研究员, 研究方向: 以类精子胚胎干细胞为工具的人类复杂疾病的动物模拟。E-mail: yfding@sibcb.ac.cn

A New Strategy for Constructing Mouse Models of Complex Diseases: Semi-cloning Technology Based on Sperm-like Haploid Embryonic Stem Cells

LAI Suomei^{1,2}, DING Yifu¹, LI Jinsong¹

(1. Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Correspondence to: LI Jinsong, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn; DING Yifu, E-mail: yfding@sibcb.ac.cn

[Abstract] The development of haploid genetics has motivated studies on genome evolution and function, especially the technological advancements in recent years have prompted the birth of culture techniques for mammalian haploid embryonic stem cells (haESCs). Sperm-like haESCs are novel haESCs derived from mouse parthenogenetic blastocysts. Sperm-like haESCs only contain paternal genetic material, and their sex chromosome is the X chromosome. They can self-renew, differentiate, and proliferate *in vitro* for a long time. Furthermore, editing single or multiple genes using the CRISPR system is possible for sperm-like haESCs, which can replace sperms to fertilize oocytes. In contrast to traditional methods for constructing mouse models, such as pronuclear injection, cytoplasmic injection, and tetraploid complementation, by injecting sperm-like haESCs after gene editing into oocytes, semi-cloned mice with a definitive genotype can be obtained efficiently and stably without chimerism, and primary mice can be used for research. The mouse disease model based on multiple precisely edited genes obtained from sperm-like haESCs can explain the effect of multiple genes synergistic interaction at the level of biological individuals to completely simulate various pathological characteristics of complex human diseases that may be affected by multiple genes, and this model facilitates the exploration of novel diagnostic and therapeutic methods.

[Key words] Haploid; Sperm-like haploid embryonic stem cells; CRISPR/Cas9; Mouse disease model

由于能够掩盖发生的隐性突变，提高环境适应度，二倍体基因组是大多数动物的典型特征，但这恰好限制了基于突变研究的遗传学的发展^[1]。而单倍体基因组具有外显优势，非常适合用于在体外分析各种突变对基因功能的影响。在自然状态下，因酵母能够以单倍体形式稳定存活^[2]，故围绕功能基因筛选的研究常常在酵母上开展。同时，科研人员一直试图构建一种可用于体外筛选的单倍体细胞系，尤其是哺乳动物的单倍体细胞系。

自然状态下哺乳动物体内的单倍体细胞只有精子和卵细胞，但是目前的技术尚无法实现体外长期培养精子或卵细胞以用于研究^[3-4]。科研人员在19世纪70年代就探索利用胚胎分割^[5]、孤雌激活卵母细胞^[6]、显微去除原核^[7]等方法构建单倍体胚胎，并成功地获得了小鼠的单倍体胚胎^[8]。然而单倍体基因组在体外会自发地二倍体

化，因此体外长期培养单倍体细胞成为了一个难以逾越的壁垒。直到2011年，科研人员才实现哺乳动物单倍体胚胎干细胞的体外培养^[9]。

因为单倍体细胞的突变都是显性的，在类精子单倍体胚胎干细胞技术诞生之前，单倍体的应用主要集中于功能基因筛选。2009年，Carette等^[10]借助人慢性髓细胞性白血病细胞系KBM-7（该细胞系除了8号染色体外，其余染色体都是单倍体核型）进行遗传筛选。他们利用KBM-7单倍体细胞筛选细胞致死性膨胀毒素（cytotoxic distending toxins, CDTs）所必需的宿主因子，并通过在单倍体上大规模敲除基因，使得筛选病原体致病所必需的宿主因子如毒素、病毒、受体的配体成为可能。最后研究者成功找到了鞘磷脂合成酶1和G蛋白偶联受体TMEM181分别独立地插入失活的抗CDTs的细胞系。2008年，Chong等^[11]构建了条件性Drosha敲除的小鼠。Drosha

在细胞核中催化 pri-miRNA 转录产物转化为 pre-miRNA 茎环前体^[12]，这对于 miRNA 加工的起始非常重要。2011 年之前尚无 Drosha 敲除细胞系的报告。直到 2011 年，Elling 等^[13] 利用基因诱捕 (gene trap) 技术，在单倍体细胞上获得了一株不表达 Drosha 的细胞系。

在过去的一个世纪里，基因筛选已经帮助人们阐明了多种生物学过程^[14]。但对于基因功能的研究，尤其是复杂的人类疾病，仅在细胞水平上进行基因筛选是远远不够的，一些简单的动物模型不足以阐明疾病发生的具体机制。因此，构建更贴近人类发病模式的复杂疾病小鼠模型在疾病相关研究中显得非常重要。

近几十年来，基因编辑小鼠模型使得生物领域的基础研究有了飞跃式进展，尤其是与人类有关的研究如衰老^[15]、肿瘤^[16]、自闭症^[17]、抑郁症^[18]、肥胖^[19]，以及各种器官损伤、再生、修复等基础研究。但科研工作者仍然渴求在短时间内以较低成本获得特定的基因型小鼠，这需要实现基因组的编辑，并将这种编辑传递到生殖系中。人们最开始是通过同源重组实现基因组的编辑，然后是病毒介导的转基因、重组锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN) 和转录激活因子样效应蛋白核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 技术，尤其是 2020 年诺贝尔化学奖得主 Charpentier 和 Doudna 等开发的成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /CRISPR 相关蛋白核酸酶 9 (CRISPR-associated nuclease 9, Cas9) 技术。这些技术的出现使得基因组编辑越来越便捷、精准。例如，应用原核注射或卵胞质内注射，或者通过囊胚注射，可以将基因编辑上升到小鼠个体水平。

遗憾的是，采用常规的动物模型建立技术产生的模型小鼠存在或多或少的嵌合，嵌合体需要通过交配获得无嵌合的小鼠。而如果是多基因同时编辑的模型动物，在交配时由于存在基因分离现象，会极大地增加饲养与鉴定的成本。2012 年类精子单倍体胚胎干细胞的诞生^[20] 以及后续的优化工作^[21]，证明了利用类精子单倍体胚胎干

细胞可以高效地获得多基因杂合编辑的半克隆小鼠，可直接将细胞水平的编辑传递到小鼠个体水平，为人类复杂疾病的动物模型研究带来了新的工具。

1 类精子单倍体胚胎干细胞技术的发展历程

核移植技术和单倍体胚胎干细胞培养技术的优化，使得从单倍体胚胎中获取可体外稳定培养的单倍体胚胎干细胞成为可能^[22]。1970 年，Freed 等^[23] 在美洲豹蛙的孤雄胚胎中建立了两株单倍体细胞系，其中一株可以传代 200 次以上。1975 年，Philippe 等^[24] 成功在体外培养了蟑螂孤雌胚胎来源的单倍体细胞。1978 年，Debec^[25] 建立并培养了黑腹果蝇的单倍体细胞。1999 年，Kotecki 等^[26] 从慢粒细胞白血病患者的骨髓中通过连续亚克隆的方式分离出了“近单倍体”的细胞系 KBM-7，该细胞系中除了 8 号染色体是 2 条，其余皆为 1 条。2009 年，Yi 等^[27] 构建了青鳉鱼孤雌单倍体多能干细胞，再次将单倍体细胞的研究推向高潮。然而在哺乳动物胚胎中，单倍性维持和发育并不兼容，尽管在卵圆筒期 (egg cylinder stage) 的孤雌胚胎中观察到了单倍体细胞的存在，但是存活的胚胎中细胞多为二倍体^[9]。直到 2011 年，Leeb 等^[9] 引入了 2i 培养系统 (含有两个小分子抑制剂 PD184352、CHIR99021) 后，才成功获得了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞，并通过流式分选富集单倍体，可在体外维持该细胞系的单倍性 35 代左右。PD184352 和 CHIR99021 通过抑制糖原合成酶激酶 3 和丝裂原活化的细胞外信号调节激酶信号通路，促进胚胎干细胞的自我更新^[28-29]，白血病抑制因子可抑制胚胎干细胞的分化^[29]。同年 Elling 等^[13] 也建立了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系。但是 Leeb 和 Elling 等只是通过多能性实验验证了他们获得的孤雌单倍体胚胎干细胞具有体内外的分化能力，研究并未证明其获得的小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞能否发生生殖系嵌合，是否保留母源基因组的表观遗传特性，以及是否能代替卵子基因组获得半克隆小鼠。

单倍体胚胎干细胞研究的一个重大突破是

2012年Li带领的团队首次建立了小鼠孤雄胚胎来源的单倍体胚胎干细胞,这些孤雄单倍体胚胎干细胞保持了大部分的父源印记,表达典型的多能性基因,并在注射到二倍体囊胚时,可嵌合发育成生殖系在内的各种组织;最重要的是孤雄单倍体胚胎干细胞在注入卵母细胞后可以产生可育的小鼠^[20]。同年Zhou带领的团队也独立建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞,并证明了这类细胞替代精子内遗传物质的可能性^[30]。

此外,孤雄单倍体胚胎干细胞的出现使得复杂基因编辑小鼠的获取变得更加容易。但是通过注射孤雄单倍体胚胎干细胞获得小鼠的效率很低,不到移植胚胎的2%,并且还有大约50%的半克隆小鼠呈现出生长迟缓的表型,在出生后不久就死亡。低出生效率、生长迟缓的现象直接阻碍着利用孤雄单倍体胚胎干细胞构建基因修饰小鼠。直到2015年,Zhong等^[31]利用CRISPR/Cas9技术在孤雄单倍体胚胎干细胞中将H19、IG差异性甲基化区域(differentially methylated region, DMR)敲除,这种敲除后的孤雄单倍体胚胎干细胞的基因组更接近精子中的状态;进一步将双敲除的孤雄单倍体干细胞注射到卵母细胞后,产生健康半克隆小鼠的效率高达22.3%,这比2012年Yang等^[20]的研究结果提高了10倍,真正意义上将孤雄单倍体胚胎干细胞由概念上的创新转变为类精子单倍体胚胎干细胞这一强有力的构建小鼠模型的工具。次年,Yang等^[32]通过孤雌激活的方法,成功获得了两株食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞MPH1和MPH2。食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞具有胚胎干细胞的典型特征;最重要的是,食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞支持体外遗传操作,能够用于大规模的遗传筛选研究。

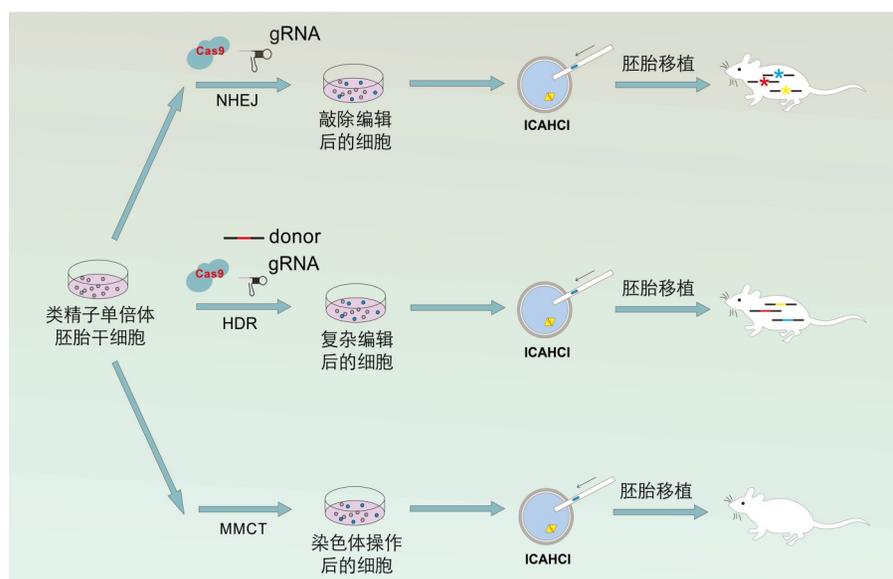
2016年Li等^[33]将小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞和大鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞融合在一起,形成的异源二倍体不仅含有稳定的基因组,而且具有分化成三胚层和早期生殖细胞的多能性;同时,小鼠和大鼠单倍体胚胎干细胞的等位基因对异源二倍体中的基因表达贡献类似。同年Sagi等^[34]和Zhong等^[35]分别采用孤雌激活和去除受精卵雄原核的方式,从单倍体孤雌囊胚中获得了人单倍体胚胎干细胞系。随后,Zhong等^[35]

和Li等^[36]证明将敲除了2个印记基因DMR(H19、IG)的孤雌单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞中,可以产生存活的孤雌来源小鼠。2年后,Li等^[37]研究发现,敲除了7个母源性高甲基化印记基因(Nespas、Grb10、Igf2r、Snrpn、Kcnq1、Peg3和Gnas)的孤雄单倍体胚胎干细胞和精子共注射后,采用四倍体补偿技术,可以产生存活的孤雄小鼠,但是这些孤雄小鼠出生后不久便相继死亡,提示目前仍有很多的印记相关问题有待研究。

2 类精子单倍体胚胎干细胞的特性

为了获得类精子单倍体胚胎干细胞,首先需要将受精卵中的雌原核去除以获得孤雄单倍体胚胎,进一步将体外培养至囊胚时期的孤雄单倍体胚胎的内细胞团分离进行培养,就可以获得类精子单倍体胚胎干细胞。类精子单倍体胚胎干细胞兼具二倍体干细胞和单倍体精子的诸多特性,其本质仍是胚胎干细胞,因此在形态、分化、增殖、基因表达图谱等方面都十分类似于二倍体胚胎干细胞。

类精子单倍体胚胎干细胞在体外可形成拟胚体,并进一步分化为各类型的细胞。向严重免疫缺陷小鼠皮下注射类精子单倍体胚胎干细胞后,可产生包含所有胚层的畸胎瘤。把类精子单倍体胚胎干细胞注射到二倍体囊胚中后,可以在12.5 d的胚胎中体细胞和生殖系中检测到类精子单倍体胚胎干细胞的痕迹^[30]。Yang等^[20]通过免疫印迹发现,类精子单倍体胚胎干细胞表达胚胎干细胞的标志基因如Nanog、Oct4、Sox2和SSEA1,微阵列表达图谱表明其基因表达模式与小鼠的二倍体胚胎干细胞接近。类精子单倍体胚胎干细胞只有一套父源的遗传物质,它的性染色体是X染色体,通过卵胞质内单细胞注射技术,将类精子单倍体胚胎干细胞注射进卵母细胞,可以使之受精并发育,产生后代全为雌性的半克隆小鼠。类精子单倍体胚胎干细胞和孤雌单倍体细胞相近,通过定期的流式细胞分选富集单倍体^[13, 20, 30],可以在体外长期传代培养并保持单倍体性。上述这些特性使得类精子单倍体胚胎干细胞支持多轮的基因编辑,进而获得携带多基因编辑的小鼠(图1)。



注：NHEJ 全称 Non-homologous end joining，即非同源末端连接；HDR 全称 Homologous recombination，即同源重组；MMCT 全称 Microcell mediated chromosome transfer，即微细胞介导的染色体转移技术；ICAHCI 全称 Intracytoplasmic AG-haESCs injection，即卵胞质内孤雄单倍体细胞注射术；gRNA 全称 guide RNA，即向导 RNA。

图 1 类精子单倍体胚胎干细胞上的遗传修饰可以一步传递至子代小鼠中

Figure 1 Genetic modification of sperm-like haploid embryonic stem cells can be transmitted to offspring mice in one step

3 基因修饰小鼠模型的发展历史

基因修饰小鼠模型一直是科学界广泛使用的动物模型之一。1974年 Jaenisch 等^[38] 将猴空泡病毒 40 (SV40) DNA 注射到小鼠囊胚腔内，这些囊胚大约有 40% 可以正常发育且在 1 岁时也未检测到肿瘤；用从这些动物的不同器官中提取的 DNA 进行 SV40 特异性 DNA 序列检测，结果显示大约 40% 的成年小鼠的器官中检测到了 SV40 表达。1976 年 Jaenisch^[39] 又用小鼠白血病病毒 (M-MuLV) 感染刚出生的小鼠和植入前的小鼠胚胎 (4~8 细胞时期)，两种小鼠均出现病毒诱导的白血病。与新生小鼠感染不同，着床前胚胎的感染可导致病毒整合到生殖系中并传递给下一代。1980 年 Gordon 等^[40] 报告，将基因序列注射到小鼠胚胎的原核中，当胚胎被移植到代孕母鼠体内并发育到期时，可以成功地将目的基因序列保留在小鼠基因组中。1981 年 Evans 等^[41] 成功地建立了小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cells) 的体外培养技术。1985 年，Smithies 等^[42] 在哺乳动物细胞中通过同源重组完成对特定人类基因

的修饰，而又不影响基因组的其他部分。

胚胎干细胞的体外培养和同源重组技术的出现是伟大的突破，由于可以精确地操纵小鼠基因组，进而可以创建人类疾病的动物模型，因此在过去的 50 年里推动生物学研究取得了长足的进步^[43]。1987 年 Thomas 等^[44] 首次报告，通过体外同源重组成功突变了小鼠胚胎干细胞的内源性次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT) 基因。1993 年 Gu 等^[45] 首次应用 Cre/LoxP 系统，获得了一个删除 IgH 位点的 JH-E μ 片段小鼠品系 JHT。2009 年 Geurts 等^[46] 将编码 ZFNs 的 DNA 或 mRNA 单次注射到单细胞大鼠胚胎中，导致靶基因位点发生 25%~100% 的破坏，并且这些突变可以有效地传递给后代。2010 年 Meyer 等^[47] 通过 ZFN 介导小鼠受精卵的同源重组。2012 年 Doudna 团队与 Charpentier 团队合作，创造性地将 CRISPR/Cas9 系统用于基因组的定向编辑^[48]。2013 年 Zhang 带领的团队首次利用 CRISPR/Cas9 系统在人和小鼠细胞的内源性基因组位点上实现

了精确编辑^[49]。2015年Zhong等^[31]将CRISPR/Cas9技术与类精子单倍体胚胎干细胞相结合,通过简单的步骤可以稳定高效地批量获得基因修饰的半克隆小鼠,实现了个体水平的基因筛选。

4 构建基因修饰小鼠的胚胎操作技术

构建小鼠疾病模型主要包含两部分:基因组的编辑和胚胎的操作、培养。基因组编辑的方法主要有同源重组、病毒、转座子、ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9等。在体外培养的哺乳动物细胞中,外源DNA片段和染色体基因之间如果序列存在相似性,便会发生同源重组,只是这种重组的频率非常低^[42]。病毒介导的基因组修饰是随机的,常用的可整合到基因组上的病毒有慢病毒、逆转录病毒等。随机插入存在破坏正常基因功能的可能,需要在鉴定时加以注意。PiggyBac转座酶通过剪切/粘贴机制介导基因的转移^[50]。转座过程不依赖DNA复制,具有较高的插入效率。PiggyBac转座插入的位点同样不是固定的,存在破坏正常基因功能的可能,需在鉴定时加以注意。

ZFN与TALEN都是一类人工合成的限制性内切酶,由DNA结合域与限制性内切酶的DNA切割域融合而成,ZFN与TALEN发生的基因编辑一般是位点特异的。Cas9是一种由向导RNA(guide RNA, gRNA)引导,能够使DNA发生双链断裂的核酸内切酶。Cas9对基因组的切割依赖于与目的序列配对的gRNA序列以及序列附近的PAM(NGG)位点。CRISPR/Cas特异性编辑所依赖的gRNA的设计和合成难度也远远小于TALEN和ZFN技术的DNA识别模块的构建过程。所以,CRISPR/Cas技术是目前实现基因组精确编辑的最常用手段^[48]。

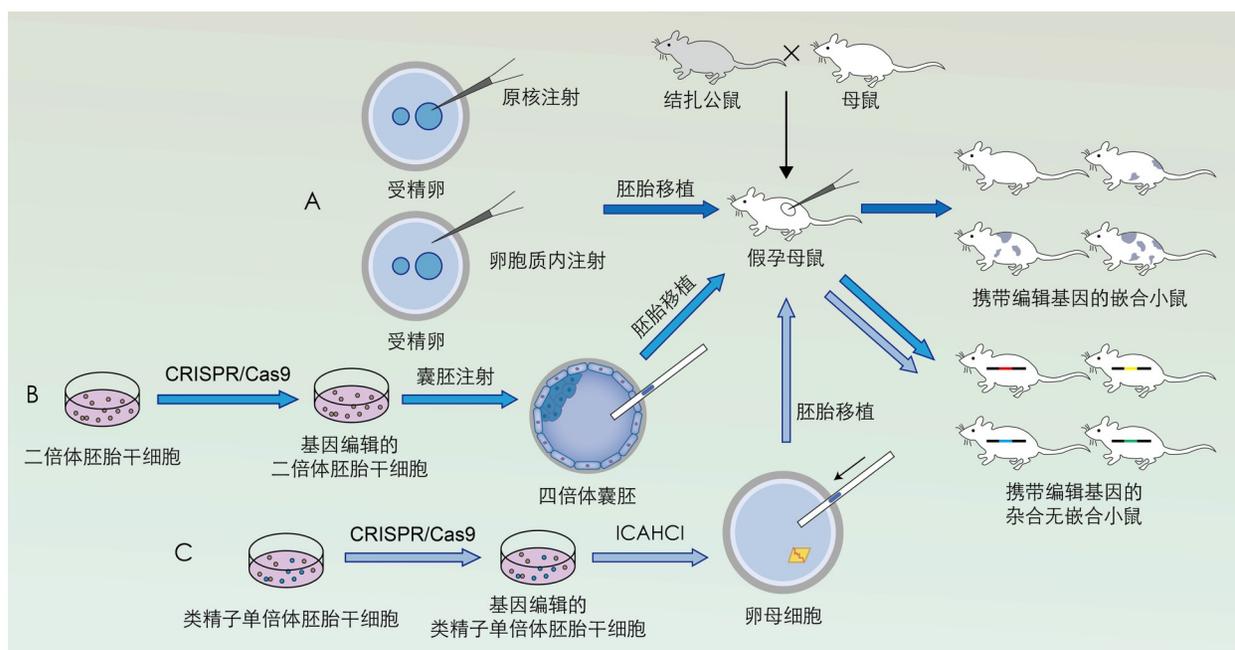
除了上述能对基因组进行修饰的分子生物学技术外,仍然需要借助胚胎操作技术将遗传修饰体现在个体水平上,才能在真正意义上建立可用于研究的基因修饰小鼠模型。目前,广泛利用原核注射、卵胞质内注射、基于胚胎干细胞的囊胚注射、四倍体补偿这4种方法来构建小鼠模型。

原核注射是第一个被证明可有效产生基因整合小鼠的技术^[40]。它将外源DNA通过显微注射

的方法注射到受精卵的原核内,注射的DNA可以整合到小鼠受精卵的基因组中,并稳定遗传给后代。由于DNA都是随机整合到基因组上,无法预测整合的转基因拷贝数,这就导致每一只原代小鼠有自身独特的整合位点、整合方式、拷贝数,需一一进行分析。原核注射也可以结合PiggyBac系统,从而限定插入局限在基因组的TTAA位点。如果一个原代小鼠的多条染色体发生转基因的整合,其后代小鼠也可能产生不同的品系。通常情况下,整合发生在二细胞时期之前,但是仍有20%~30%的原代小鼠出现基因整合延迟,发生在二细胞之后,就产生了嵌合体^[51]。而且多数原代小鼠传递的转基因频率较低,仅为5%~10%^[51]。如果想实现一只小鼠上有多种基因的转基因整合,就需要将不同的转基因小鼠相互交配。

随着CRISPR/Cas9技术的成熟,直接在卵胞质内注射体外转录的Cas9 mRNA和gRNA,或是体外组装好的Cas9蛋白与gRNA复合物也可以简单地实现基因编辑^[52],并且卵胞质内注射会比原核注射的效率更高^[53]。Cas9及gRNA进入受精卵后,在特异性的位点产生DNA的双链断裂,随后会发生非同源末端连接修复或同源重组修复,前者会产生随机的碱基插入或缺失,后者会依照同源的模板将双链断裂修复。如果在卵胞质内注射的同时给予带有同源臂的模板DNA(Donor),细胞就可以利用该模板进行修复,从而实现人为改变指定区域基因序列的效果。卵胞质内注射同样存在一定的延迟,子代小鼠大多存在一定程度的嵌合,将目的基因位点实现了特定编辑的原代小鼠与野生型小鼠交配,可以获得稳定的基因编辑小鼠。由于CRISPR/Cas系统的效率取决于gRNA,因此差异较大,但总体而言仍远高于原核注射。卵胞质内注射对RNA纯度和浓度的要求较高,否则非常影响胚胎的发育效率以及基因编辑效率(图2)。

嵌合体通常指个体的细胞基因组存在不同的现象。1961年,Tarkowski^[54]将遗传上不同的八细胞时期的胚胎的透明带移去,体外培养时让它们彼此接触,再将聚集的胚胎移植到代孕母鼠后,产生了存活的嵌合体后代。1968年,Gardner^[55]将胚胎干细胞注射到囊胚腔中也获得



注：A为向受精卵中注射基因编辑复合物（Cas9+gRNA+Donor）获得嵌合体小鼠的途径；B为通过四倍体补偿技术在四倍体囊胚中注射二倍体胚胎干细胞获得非嵌合体小鼠的途径；C为通过类精子单倍体胚胎干细胞注射高效获得非嵌合体小鼠的途径。CRISPR/Cas9 全称 clustered regularly interspaced short palindromic repeats/it-associated nuclease 9，即成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白核酸酶9基因编辑技术；ICAHCI 全称 Intracytoplasmic AG-haESCs injection，即卵胞浆内孤雄单倍体细胞注射术。

图2 构建基因修饰小鼠模型的胚胎操作方法

Figure 2 Experimental methods for constructing mouse models

了小鼠嵌合体。嵌合同样有一定概率发生在生殖系中，将这种嵌合体小鼠与野生型小鼠交配，可获得不同基因型的小鼠。这种囊胚注射发生生殖系传递的效率是不稳定的，而一种改进的被称为四倍体补偿的技术的出现弥补了这一缺陷。四倍体补偿将二细胞时期的胚胎通过电或病毒方式融合，产生四倍体的胚胎，这些四倍体的细胞后续只能发育为胚外组织，而无法发育产生健康胚胎，但如果此时向四倍体囊胚中注射二倍体的胚胎干细胞，会产生完全来源于注射的供体干细胞的健康胚胎。胚胎干细胞有着成熟的培养、编辑系统，注射经过基因编辑的胚胎干细胞到四倍体囊胚中，就可以获得基因组完全来自于注射细胞的小鼠（图2）。

利用类精子单倍体胚胎干细胞构建小鼠模型，完全排除了上述方式产生的原代小鼠基因型不确定、存在嵌合、需要回交、多次鉴定等问

题。类精子单倍体胚胎干细胞可以使卵母细胞受精形成胚胎，同时可在体外进行培养，也可结合CRISPR/Cas9系统对类精子单倍体胚胎干细胞进行基因的编辑，这个过程同对二倍体胚胎干细胞进行基因编辑一样。类精子单倍体胚胎干细胞具有单倍体的特性，每一次的编辑只会产生“是”或“否”的结果，对编辑后的细胞进行单克隆建系，通过测序就可以判断基因编辑是否如预期发生。如果需要获得多基因同时编辑的细胞，只需要在前一轮得到的细胞系的基础上再进行一轮编辑即可。由于所有的鉴定都是在细胞层面上完成，鉴定的时间成本较低，建成携带指定基因型的类精子单倍体胚胎干细胞系，注射后产生的原代小鼠的基因型均为编辑且杂合的，不存在嵌合情况，可以直接在原代小鼠中开展研究，并能够稳定地传递给下一代（图2）。

基于类精子单倍体胚胎干细胞的半克隆技术

相比于原核或卵胞质内注射、四倍体补偿技术来构建复杂的小鼠模型更具优势(表1)。但是由于只携带Y染色体的孤雄胚胎无法发育至囊胚,所以全部的类精子单倍体胚胎干细胞的性染色体都

是X染色体,注射到卵母细胞后产生的后代全部是雌性。同时如果编辑的基因本身会影响干细胞的生存、自我更新过程,细胞系就难以建立,也无法得到后代小鼠(表1)。

表1 常用于构建基因修饰小鼠模型的动物实验手段优劣势比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of different animal experiments for constructing mouse models

实验方法	优势	劣势
原核或卵胞质内注射	结合PiggyBac或CRISPR/Cas9系统相比于直接注射DNA片段,整合效率、目的基因表达效率较高,插入的基因片段更大,不需要额外构建细胞系	PiggyBac系统:可能会破坏其他基因功能;无法控制插入拷贝数;插入位点局限在TTAA位点;存在嵌合,后续需要多轮回交 CRISPR/Cas9系统:胚胎发育效率很受RNA质量影响,需要体外转录获得RNA;原代小鼠存在嵌合,需进行回交;多基因同时敲除或敲入需要连续注射或者共同注射,效率较低
四倍体补偿技术	可产生非嵌合小鼠;可快速获得目的基因型的小鼠	基因编辑二倍体胚胎干细胞较单倍体细胞复杂;出生效率较低,需要进一步扩繁;小鼠性别比例失衡,倾向于雄性;无法用于编辑影响干细胞自我更新或生存的基因
基于类精子单倍体胚胎干细胞的半克隆技术	可构建多基因同时敲除或敲入的小鼠;可一步获得非嵌合的原代杂合小鼠并直接用于研究	类精子单倍体胚胎干细胞性染色体只会是X染色体,注入卵细胞后也只能产生雌性小鼠;无法用于编辑影响干细胞自我更新或生存的基因

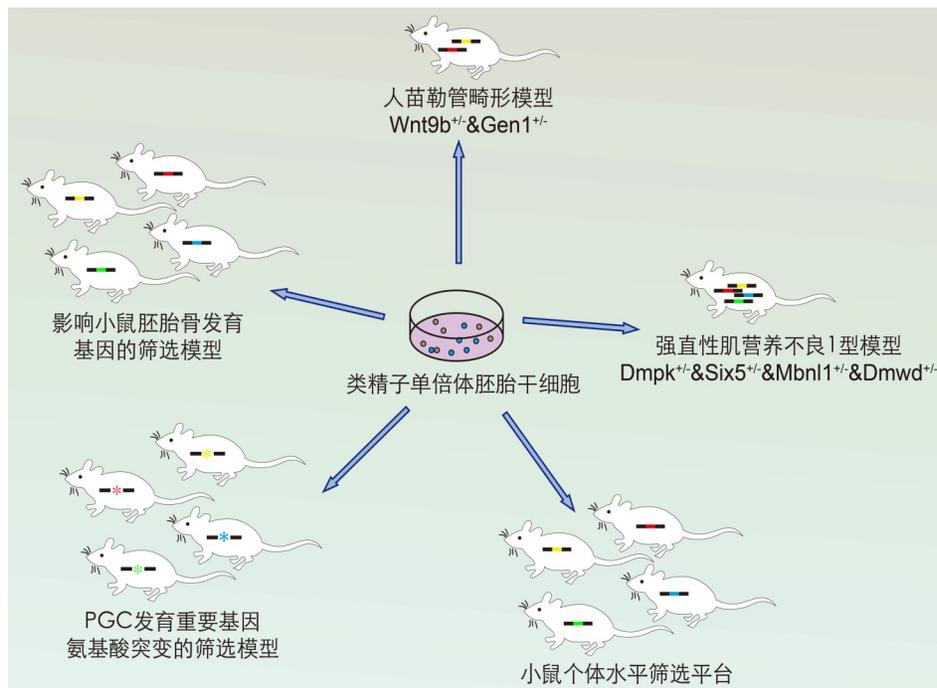
5 类精子单倍体胚胎干细胞构建小鼠模型的应用

类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术中半克隆是指将类精子单倍体胚胎干细胞注射至卵母细胞产生的后代有别于克隆产生的后代,只有一半的遗传物质来源于体外培养的细胞。基于该技术,科研人员已经在多种复杂疾病小鼠模型的构建方面取得了突破性进展(图3)。

人强直性肌营养不良1型(myotonic dystrophy type 1, DM1)是一种复杂的遗传性疾病,主要由强直性肌营养不良蛋白激酶(dystrophia myotonica protein kinase, DMPK)基因3'非编码区的CTG重复扩增引起^[56-57];通常随着重复数量的增加而加重表型,最严重时可以发展为呼吸衰竭和智力迟钝(如先天性DM1,即CDM)^[58]。许多研究都表明,CTG的重复扩增不仅影响DMPK本身的表达水平,也会影响DMPK邻近区域的染色体结构,从而降低邻近基因的表达水平^[59-60]。携带DM1相关基因Dmpk、

Six5和Mbnl1的其中任何一个基因杂合突变的小鼠只能部分重现DM1患者的症状^[61-63],而任何一个纯合突变的小鼠病情会加重。但在DM1患者中,几乎不存在Dmpk、Six5和Mbnl1这几个相关基因的纯合突变。

另外一种DM1的小鼠模型构建策略是侧重于重现CTG的重复。如携带人骨架肌动蛋白基因HAS的转基因小鼠,其肌肉HAS非编码区插入了大约250个CUG重复扩增^[64]。这种转基因小鼠在肌肉多个方面出现了和DM1患者一样的表型,但并没有出现DM1患者常见的其他症状,如肌肉萎缩和白内障^[64]。DM1患者出现肌肉萎缩、白内障、胰岛素抵抗、心脏传导缺陷等多方面的症状,很可能是上述多个基因的表达不足导致^[65-66]。但限于传统方法的局限性,难以获得如此多基因同时敲除的小鼠,多基因表达不足的猜想一直未得到实验验证。2019年,Yin等^[58]通过将Dmpk、Six5和Mbnl1这3个基因敲除的类精子单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞后,产生的杂合小鼠出现了DM1的部分表型;进一步将



注：PGC全称primordial germ cells，即原始生殖细胞。

图3 类精子单倍体胚胎干细胞在构建疾病模型上的应用

Figure 3 Application of sperm-like haploid embryonic stem cells in the construction of disease model

Dmpk、Six5、Mbnl1 和 Dmwd 共4个基因敲除的类精子单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞后，产生的杂合小鼠重现了DM1患者的绝大多数病理状态。四基因敲除的杂合小鼠模型直接证明了多基因剂量不足效应确实能够导致DM1。

苗勒管异常（Müllerian anomalies, MA）包括子宫、宫颈、输卵管或阴道的各种解剖学畸形^[67-69]。MA女性的生殖能力低下，同时要承受巨大的心理痛苦^[70]。关于MA的病因，遗传危险因素通常被认为具有很强的影响力。但是由于MA患者个体之间存在广泛的基因异质性，很难确定潜在的致病基因^[70]。先前的一些研究提示，基因组拷贝数变异（copy number variations, CNV）参与了MA致病^[70]。2019年，Wang等^[70]分析了25例MA患者的全基因组杂交芯片数据，发现其中有3例患者和苗勒管发育有关的基因Gen1（1/25）、Tbx6（1/25）和Lhx1（1/25）存在基因拷贝数差异。为了进一步了解这些基因的拷贝数差异是否会造成苗勒管发育异常，研究人员对新的100例MA患者的qPCR数据检验后发现，其中有6例患者的Tbx6（4/100）和Lhx1

（2/100）存在基因拷贝数差异。但是Gen1基因杂合敲除小鼠并没有展现出任何苗勒管畸形表型，提示单基因缺陷并不足以导致苗勒管畸形，而很可能是多基因缺陷造成的。研究人员后续对这9例MA患者进行全基因组测序分析，将目光锁定到了Gen1/Wnt9b以及Tbx6/Gata3这两种基因组合。通过分析由类精子单倍体胚胎干细胞一步获得的Gen1/Wnt9b双杂合敲除小鼠的子宫发现，其确实比Gen1或Wnt9b单杂敲除小鼠的子宫发育畸形程度更严重，从而证明Gen1和Wnt9b双基因缺陷导致了苗勒管畸形的产生^[70]。有趣的是，研究人员还确定了4例携带Gen1有害突变，但没有Wnt9b有害突变的个体，这支持Gen1突变对MA致病的遗传贡献。由于Gen1中的单个突变不足以引起人或小鼠的MA，其他基因有害突变可能与Gen1突变协同作用而引起MA，与MA的高度遗传异质性相符。总之，这些结果均表明Gen1/Wnt9b是MA致病基因中一个重要的组合，并提示Gen1是MA的主要致病因素^[70]。

稳定表达Cas9的类精子单倍体胚胎干细胞

和gRNA文库结合会产生一种非常高效便捷的小规模基因筛选系统。每个类精子单倍体胚胎干细胞中转染一种gRNA后,其基因组被稳定表达的Cas9切割,实现对应的一个基因的编辑,注射到卵母细胞后又会进一步切割母源基因组,产生纯合敲除的小鼠。2019年Bai等^[71]通过向卵母细胞注射稳定表达Cas9和以72个预选基因为靶标的gRNA文库的类精子单倍体胚胎干细胞系,建立了一个文库基因突变的半克隆小鼠库,并通过对出生小鼠的骨骼分析筛选出了4个与骨骼发育相关的基因,其中Zic1和Clec11a已被报告是骨骼发育所必需的基因,而Rln1和Irx5基因从未有研究表明对骨骼有影响。Rln1纯合敲除小鼠仅在出生时骨骼较小,而Irx5纯合敲除小鼠由于骨量减少和骨髓脂肪生成增加,在出生后和成年阶段均显示骨骼异常^[4, 71]。利用类似的策略,2018年Li等^[72]结合CRISPR/Cas9介导的单碱基编辑器发现了小鼠原始生殖细胞(primordial germ cells, PGC)发育的重要基因Dnd1上有4个与PGC发育相关的氨基酸。这种对蛋白质关键氨基酸进行体内遗传筛选的系统,为蛋白质结构和功能的研究开辟了一个新的体系^[4]。该体系的一个潜在应用是在小鼠中筛选与疾病发展相关基因的功能位点,并与已有的SNVs数据库进行比对,以预测疾病相关基因的致病位点^[73]。

上述研究为人和小鼠中多基因致病理论提供了实验证据,证明利用类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术作为一种快速有效的实验检测手段,可用于鉴定复杂疾病的小鼠模型中遗传变异的致病性组合。

6 类精子单倍体胚胎干细胞技术构建小鼠模型的展望

人类遗传学在研究方法和概念上的进步加快了对人类致病基因的鉴定过程。当某种疾病涉及一个以上基因时,准确判断各致病基因突变的贡献率及其组合形式至关重要。越来越多疾病的遗传和突变数据也逐渐阐明了多个基因(包括等位基因)联合作用如何产生表型效应^[74]。生物学、医学、进化学对于疾病的定义各不相同,但是毋庸置疑的是,环境、文化、人口等外在因素和遗传内在因素交错在一起导致了疾病的复杂性以及

人类群体在各种简单或者复杂疾病发生率上的差异。复杂性状疾病(complex disease)的发病由多个基因位点共同参与,且与环境因素相互作用决定疾病表型,往往是遗传疾病,如心血管疾病、肿瘤性疾病、自身免疫病等^[75]。而且在遗传疾病中,如果涉及染色体结构或数量异常,也会增加该遗传疾病的复杂性。基于类精子单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术可以获得多基因突变的小鼠,可以较优地模拟涉及多基因、染色体异常(非整倍体)这类复杂的疾病,从而发挥其对高风险人群的预测、筛查及干预作用,为复杂性状疾病提供更准确的诊断、预后工具。

以神经退行性疾病肌萎缩侧索硬化征为例,肌萎缩侧索硬化征(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)即Lou Gehrig's disease病,是一种成人发病且致命的罕见神经退行性疾病^[76]。ALS以进行性肌肉无力、肌肉萎缩和最终瘫痪为特征,诊断后患者生存期从2年到5年不等,仅有10%的ALS患者可以存活10年以上^[77]。ALS实际上和许多成人发病的神经退行性疾病共享许多临床和病理学特征,如额颞叶痴呆(frontotemporal dementia, FTD)。在许多患者中,也会观察到ALS和FTD的共同存在;其中约15%的FTD患者会发展为ALS,5%~22%的ALS患者发展为FTD^[78]。目前公认的ALS发病机制主要有以下方面:RNA稳定性改变、代谢失调、运动神经元细胞骨架破坏^[79]、内质网压力和蛋白质稳态失调、线粒体结构或功能受损、谷氨酸介导的兴奋性毒性、胶质细胞丧失功能、免疫功能失调及代谢障碍。自1993年报告第一个ALS相关基因SOD1后^[80],迄今为止已发现超过50个基因在其突变的情况下可能引起ALS^[81],只是这些基因对ALS的贡献程度有大有小,而且这些基因存在相同或截然不同的功能,这给早期临床诊断带来了巨大的挑战。

C9ORF72、SOD1、TDP-43、TBK1、OPTN等基因只能解释不到50%的ALS/FTD患者发病原因^[81]。而且很多时候某个基因的突变不会影响ALS/FTD进展,或者即使影响ALS/FTD的发生,但不显著改变生存时间;甚至某些基因突变反而可以减缓ALS的症状。Gerbino等^[82]研究表

明,小鼠表达人的丧失功能、无义突变的TBK1时,并不会出现和神经退行有关的症状;但是如果在SOD1^{G93A}这样经典的ALS小鼠中特异性敲除TBK1后,会削弱自噬,增加SOD1聚集,加速疾病进展,但不改变生存时间。更令人困惑的是,TBK1上的点突变同样可以加速疾病的发生,但可以延长生存时间。

遗传异质性、多基因共同效应、每个基因存在不同的突变点、基因功能的交叉性、神经元与周围的胶质细胞共同作用等多方面因素,使得ALS/FTD的深入研究及临床诊治进展缓慢,既缺乏ALS发病早期确诊的遗传学证据,也缺乏有效的治疗药物。目前被FDA批准上市的只有2种药物(利鲁唑和依达拉奉),既不能治愈ALS/FTD,也不适用于所有的ALS/FTD患者,且药物对于中位生存时间的增加效果相当有限,其中一个重大的障碍是缺乏研究ALS的小鼠模型。

1994年Gurney等^[83]通过转基因使得小鼠中高表达含有G93A点突变的人SOD1蛋白的突变体,这些小鼠脊髓中运动神经元丧失导致一条或多条肢体瘫痪,并在5~6个月龄时死亡。SOD1^{G93A}小鼠模型确实重现了ALS的一些指征,如突变的SOD1蛋白异常聚集^[84],星形胶质细胞中EAAT2谷氨酸转运体的丧失导致运动神经元产生兴奋性毒性死亡^[85]。米诺环素(minocycline)、头孢曲松(ceftriaxone)、塞来昔布(celecoxib)、来那度胺(lenalidomide)和其他抗炎药物在SOD1^{G93A}小鼠中被证明有疗效,但在临床试验中全部失败^[86]。其中一个关键点在于,ALS患者存在实质性的皮质运动神经元退行性变,但是在大多数SOD1^{G93A}小鼠模型中并没有明确地看到实质性的皮质运动神经元退行性变^[87]。而且高达50%的ALS患者会共同发展为FTD,而在SOD1^{G93A}小鼠模型中未发现^[87]。

除了SOD1^{G93A}小鼠模型外,TDP-43小鼠模型也常被用来研究ALS。但无论是SOD1还是TDP-43,单一基因缺陷的小鼠模型都无法完全模拟ALS患者的典型病症。如果采用类精子单倍体胚胎干细胞技术,先在细胞水平上获得多个致病基因同时修饰的突变系,除了可以进行神经元的定向分化以检测其对神经元细胞功能的影响

外,还可以通过半克隆技术注射后获得杂合突变的小鼠,有望更好地在小鼠上模拟出ALS症状。

除了多基因有关的复杂疾病外,基于类精子单倍体胚胎干细胞获得的半克隆小鼠也非常适合应用于染色体数目变化相关疾病的研究。人类胚胎早期致死、流产或出生后发育缺陷的一个重要原因是染色体数目的异常,其中三体是染色体数目变异的一种最普遍的形式^[88]。临床上公认的35%的自然流产和4%的死产是由于染色体三体或单体造成,约有0.3%的新生儿为非整倍染色体组^[89]。

获得非整倍性染色体组小鼠模型,研究其发育过程是相当复杂的。1983年Gropp等^[90]通过育种获得了多种常染色体三体的小鼠胚胎,其中许多三体的胚胎都无法存活到器官发生阶段;将存活时间较长、三体胚胎来源的造血干细胞移植到辐射损伤的小鼠体内后发现,不同三体胚胎来源的造血干细胞对造血系统受损小鼠的生存支持能力差异巨大,其中19号染色体三体胚胎来源的造血干细胞对受损小鼠的支持最好,可以支撑小鼠存活12个月。2004年Baker等^[91]发现纺锤体组装检查点蛋白BubR1水平较低的小鼠表现为渐进性非整倍体化,并伴随着寿命短、急腹症、矮小、跛行、白内障、皮下脂肪丢失和伤口愈合受损等多种特征。2008年Lavon等^[92]从非整倍体胚胎中获得整倍体人类胚胎干细胞,阐明了整倍体和非整倍体嵌合体胚胎发育过程中,由于整倍体具有竞争优势,因此随着发育进行,非整倍体细胞逐渐消失。2016年Bolton等^[93]通过活胚胎成像和嵌合胚胎的单细胞追踪技术,发现从囊胚开始,非整倍体细胞逐渐减少;而且通过非整倍体和整倍体嵌合实验证明,一定比例的整倍体细胞即可支持胚胎发育。染色体三体小鼠模型中,较常见的一种是Ts16小鼠。小鼠第16号染色体的远端部分和人类第21号染色体的长臂之间存在同源性,所以Ts16小鼠常被应用于研究人类三体综合征。Ts16小鼠胎儿具有许多相似的表现特征,包括心脏缺陷和鼻肉瘤,只是Ts16小鼠胎儿会在子宫内死亡,使得Ts16小鼠的研究仅限于早期发育阶段^[94]。后续Davisson等^[94]构建了Ts65Dn小鼠模型,Ts65Dn小鼠能存活至36个月,与人类第21号染色体长臂具有广泛的同源

性。但Ts65Dn小鼠模型只包含了人类第21号染色体长臂的绝大部分，而长臂的少部分以及短臂都被排除在外。如果通过类精子单倍体胚胎干细胞技术，在细胞水平上先构建染色体数目差异的细胞系，再将其注射进卵母细胞中获得胚胎，可排除常规技术嵌合率低的问题，能更方便地得到非正常倍性的小鼠模型资源，有助于阐明发生非整倍性现象背后的原因。

综上，基因修饰小鼠模型的使用让阐明疾病发生机制和进行新药临床前试验更为直观、简便。目前使用传统技术手段如原核注射、卵胞质内注射、基于胚胎干细胞的囊胚注射或四倍体补偿获得的小鼠模型只是部分模拟了人类疾病的一些基因突变，尚不能完全概括人类疾病的生理和病理机制。要想解决这些问题，需要建立一个可以最大程度上模拟患者复杂体系及相关复杂机制的人源化或类人化小鼠模型^[95]，这需要科学界的共同合作。例如，可以结合临床上患者的病理、家系、相关基因突变等信息，利用类精子单倍体胚胎干细胞获得和患者携带基因突变一致或相关基因人源化的小鼠模型。这些小鼠的疾病症状和严重程度可以更好地反映某些基因对疾病的贡献，以实现生物医学研究的最终目标：更深入地了解人类疾病的致病机制，进而开发出新的诊断方法和改进疗法。类精子单倍体胚胎干细胞技术的出现为构建精确可控、多基因、复杂编辑的小鼠模型提供了一种全新的有力工具。

参考文献：

- [1] WUTZ A. Haploid animal cells[J]. *Development*, 2014, 141(7):1423-1426. DOI:10.1242/dev.102202.
- [2] HARTWELL L H, CULOTTI J, PRINGLE J R, et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast[J]. *Science*, 1974, 183(4120): 46-51. DOI: 10.1126/science.183.4120.46.
- [3] SHI L, YANG H, LI J. Haploid embryonic stem cells: an ideal tool for mammalian genetic analyses[J]. *Protein Cell*, 2012, 3(11): 806-810. DOI: 10.1007/s13238-012-2096-4.
- [4] 丁一夫, 李劲松, 周琪. 哺乳动物单倍体胚胎干细胞的建立与应用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(12): 1635-1651.
- [5] TARKOWSKI A K, ROSSANT J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes[J]. *Nature*, 1976, 259(5545):663-665. DOI:10.1038/259663a0.
- [6] TARKOWSKI A K, WITKOWSKA A, NOWICKA J. Experimental parthenogenesis in the mouse[J]. *Nature*, 1970, 226(5241):162-165. DOI:10.1038/226162a0.
- [7] MODLIŃSKI J A. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus[J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 33(4):897-905.
- [8] 陈俏羽, 王俊政, 李荣凤. 单倍体胚胎干细胞研究进展及思考[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(1):71-77.
- [9] LEEB M, WUTZ A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 2011, 479(7371):131-134. DOI:10.1038/nature10448.
- [10] CARETTE J E, GUIMARAES C P, VARADARAJAN M, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens[J]. *Science*, 2009, 326(5957): 1231-1235. DOI:10.1126/science.1178955.
- [11] CHONG M M, RASMUSSEN J P, RUDENSKY A Y, et al. The RNase III enzyme Droscha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(9):2005-2017. DOI:10.1084/jem.20081219.
- [12] WU H, XU H, MIRAGLIA L J, et al. Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47): 36957-36965. DOI:10.1074/jbc.m005494200.
- [13] ELLING U, TAUBENSCHMID J, WIRNSBERGER G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 563-574. DOI: 10.1016/j.stem.2011.10.012.
- [14] NÜSSELEIN-VOLHARD C, WIESCHAUS E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287(5785): 795-801. DOI: 10.1038/287795a0.
- [15] VANHOOREN V, LIBERT C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(1): 8-21. DOI:10.1016/j.arr.2012.03.010.
- [16] IKEHARA Y, YAMAGUCHI T, IKEHARA S. Mouse models of cancer[M]//*Glycoscience: Biology and Medicine*. Tokyo: Springer Japan, 2014: 1-5. DOI: 10.1007/978-4-431-54836-2_194-1.
- [17] SILVERMAN J L, YANG M, LORD C, et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(7): 490-502. DOI:10.1038/nrn2851.
- [18] GOODWILL H L, MANZANO-NIEVES G, GALLO M, et al. Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(4):711-720. DOI:10.1038/s41386-018-0195-5.
- [19] KEPPELY L J W, WALKER S J, GADEMSEY A N, et al. Nervonic acid limits weight gain in a mouse model of diet-induced obesity[J]. *Faseb J*, 2020, 34(11):15314-15326. DOI:10.1096/fj.202000525r.

- [20] YANG H, SHI L, WANG B A, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2012, 149(3):605-617. DOI:10.1016/j.cell.2012.04.002.
- [21] WANG L B, LI J S. 'Artificial spermatid'-mediated genome editing[J]. *Biol Reprod*, 2019, 101(3):538-548. DOI:10.1093/biolre/iox087.
- [22] SUBTELNY S. The development of haploid and homozygous diploid frog embryos obtained from transplantations of haploid nuclei[J]. *J Exp Zool*, 1958, 139(2):263-305. DOI:10.1002/jez.1401390204.
- [23] FREED J J, MEZGER-FREED L. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos[J]. *PNAS*, 1970, 65(2):337-344. DOI:10.1073/pnas.65.2.337.
- [24] PHILIPPE C, LANDUREAU J C. Culture of cockroach embryonic cells and hemocytes of parthenogenic origin. Maintenance *in vitro* of haploid and aneuploid forms [J]. *Exp Cell Res*, 1975, 96(2):287-296. DOI:10.1016/0014-4827(75)90259-1.
- [25] DEBEC A. Haploid cell cultures of *Drosophila melanogaster*[J]. *Nature*, 1978, 274(5668): 255-256. DOI:10.1038/274255a0.
- [26] KOTECKI M, REDDY P S, COCHRAN B H. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 252(2):273-280. DOI:10.1006/excr.1999.4656.
- [27] YI M, HONG N, HONG Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells[J]. *Science*, 2009, 326(5951):430-433. DOI:10.1126/science.1175151.
- [28] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Nature*, 2008, 453(7194):519-523. DOI:10.1038/nature06968.
- [29] DAVIES S P, REDDY H, CAIVANO M, et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors[J]. *Biochem J*, 2000, 351(pt 1):95-105. DOI:10.1042/0264-6021:3510095.
- [30] LI W, SHUAI L, WAN H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice[J]. *Nature*, 2012, 490(7420): 407-411. DOI: 10.1038/nature11435.
- [31] ZHONG C, YIN Q, XIE Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 221-232. DOI: 10.1016/j.stem.2015.06.005.
- [32] YANG H, LIU Z, MA Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes[J]. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1187-1200. DOI:10.1038/cr.2013.93.
- [33] LI X, CUI X L, WANG J Q, et al. Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2016, 164(1-2):279-292. DOI:10.1016/j.cell.2015.11.035.
- [34] SAGI I, CHIA G, GOLAN-LEV T, et al. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2016, 532(7597): 107-111. DOI: 10.1038/nature17408.
- [35] ZHONG C, ZHANG M, YIN Q, et al. Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus[J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 743-746. DOI:10.1038/cr.2016.59.
- [36] LI Z, WAN H, FENG G, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells[J]. *Cell Res*, 2016, 26(1):135-138. DOI:10.1038/cr.2015.151.
- [37] LI Z K, WANG L Y, WANG L B, et al. Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(5): 665-676. e4. DOI: 10.1016/j.stem.2018.09.004.
- [38] JAENISCH R, MINTZ B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA[J]. *PNAS*, 1974, 71(4):1250-1254. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1250.
- [39] JAENISCH R. Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus [J]. *PNAS*, 1976, 73(4):1260-1264. DOI:10.1073/pnas.73.4.1260.
- [40] GORDON J W, SCANGOS G A, PLOTKIN D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. *PNAS*, 1980, 77(12):7380-7384. DOI:10.1073/pnas.77.12.7380.
- [41] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156. DOI: 10.1038/292154a0.
- [42] SMITHIES O, GREGG R G, BOGGS S S, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination[J]. *Nature*, 1985, 317(6034):230-234. DOI:10.1038/317230a0.
- [43] RAABE T, WESSELSCHMIDT R L. Genetic manipulation of embryonic stem cells[J/OL]. *Human Stem Cell Manual*, 2007: 267-288. <https://doi.org/10.1016/B978-012370465-8/50025-9>.
- [44] THOMAS K R, CAPECCHI M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51(3):503-512. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90646-5.
- [45] GU H, ZOU Y R, RAJEWSKY K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting[J]. *Cell*, 1993, 73(6): 1155-1164. DOI:

- 10.1016/0092-8674(93)90644-6.
- [46] GEURTS A M, COST G J, FREYVERT Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Science*, 2009, 325(5939): 433. DOI: 10.1126/science.1172447.
- [47] MEYER M, DE ANGELIS M H, WURST W, et al. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases[J]. *PNAS*, 2010, 107(34): 15022-15026. DOI: 10.1073/pnas.1009424107.
- [48] 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. DOI:10.1126/science.1225829.
- [49] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [50] FRASER M J, CARY L, BOONVISUDHI K, et al. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP₂ in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA[J]. *Virology*, 1995, 211(2):397-407. DOI:10.1006/viro.1995.1422.
- [51] WILKIE T M, BRINSTER R L, PALMITER R D. Germline and somatic mosaicism in transgenic mice[J]. *Dev Biol*, 1986, 118(1):9-18. DOI:10.1016/0012-1606(86)90068-0.
- [52] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, 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. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- [53] YEN S T, ZHANG M, DENG J M, et al. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes[J]. *Dev Biol*, 2014, 393(1):3-9. DOI:10.1016/j.ydbio.2014.06.017.
- [54] TARKOWSKI A K. Mouse chimæras developed from fused eggs[J]. *Nature*, 1961, 190(4779):857-860. DOI: 10.1038/190857a0.
- [55] GARDNER R L. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst[J]. *Nature*, 1968, 220(5167):596-597. DOI:10.1038/220596a0.
- [56] MAHADEVAN M, TSILFIDIS C, SABOURIN L, et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene[J]. *Science*, 1992, 255(5049): 1253-1255. DOI: 10.1126/science.1546325.
- [57] BROOK J D, MCCURRACH M E, HARLEY H G, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member[J]. *Cell*, 1992, 68(4):799-808. DOI:10.1016/0092-8674(92)90154-5.
- [58] YIN Q, WANG H, LI N, et al. Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1[J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 133-145. DOI:10.1038/s41422-019-0264-2.
- [59] PETERSSON O J, AAGAARD L, JENSEN T G, et al. Molecular mechanisms in DM1-a focus on foci[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(4): 2433-2441. DOI: 10.1093/nar/gkv029.
- [60] LEE J E, COOPER T A. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy[J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(pt 6):1281-1286. DOI:10.1042/bst0371281.
- [61] KLESERT T R, CHO D H, CLARK J I, et al. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 105-109. DOI:10.1038/75490.
- [62] JANSEN G, GROENEN P J, BÄCHNER D, et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice[J]. *Nat Genet*, 1996, 13(3):316-324. DOI:10.1038/ng0796-316.
- [63] SARKAR P S, APPUKUTTAN B, HAN J, et al. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 110-114. DOI:10.1038/75500.
- [64] MANKODI A, LOGIGIAN E, CALLAHAN L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat[J]. *Science*, 2000, 289(5485): 1769-1773. DOI:10.1126/science.289.5485.1769.
- [65] GROENEN P, WIERINGA B. Expanding complexity in myotonic dystrophy[J]. *Bioessays*, 1998, 20(11):901-912. DOI: 10.1002/(sici)1521-1878(199811)20:11<901:aid-bies5>3.0.co;2-0.
- [66] LARKIN K, FARDAEI M. Myotonic dystrophy: a multigene disorder[J]. *Brain Res Bull*, 2001, 56(3-4): 389-395. DOI:10.1016/s0361-9230(01)00656-6.
- [67] VISOOTSACK J, GRAHAM J M. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2006, 1:42. DOI:10.1186/1750-1172-1-42.
- [68] RACKOW B W, ARICI A. Reproductive performance of women with müllerian anomalies[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19(3): 229-237. DOI: 10.1097/gco.0b013e32814b0649.
- [69] KOBAYASHI A, BEHRINGER R R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(12):969-980. DOI:10.1038/nrg1225.
- [70] WANG L, ZHANG Y, FU X, et al. Joint utilization of genetic analysis and semi-cloning technology reveals a digenic etiology of Müllerian anomalies[J]. *Cell Res*, 2020, 30(1):91-94. DOI:10.1038/s41422-019-0243-7.
- [71] BAI M, HAN Y, WU Y, et al. Targeted genetic screening in mice through haploid embryonic stem cells identifies critical genes in bone development[J].

- PLoS Biol, 2019, 17(7): e3000350. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000350.
- [72] LI Q, LI Y, YANG S, et al. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(11): 1315-1325. DOI:10.1038/s41556-018-0202-4.
- [73] LI Q, LI Y, YANG S, et al. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(11): 1315-1325. DOI:10.1038/s41556-018-0202-4.
- [74] BADANO J L, KATSANIS N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10):779-789. DOI:10.1038/nrg910.
- [75] 吴歆, 耿旭强, 徐沪济. 多基因风险评分在复杂性状疾病中的应用进展[J]. 诊断学理论与实践, 2020, 19(5):540-543. DOI:10.16150/j.1671-2870.2020.05.019.
- [76] AL-CHALABI A, HARDIMAN O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time [J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9(11): 617-628. DOI: 10.1038/nrneurol.2013.203.
- [77] CHIÒ A, LOGROSCINO G, HARDIMAN O, et al. Prognostic factors in ALS: a critical review[J]. Amyotroph Lateral Scler, 2009, 10(5-6):310-323. DOI: 10.3109/17482960802566824.
- [78] RAAPHORST J, DE VISSER M, LINSSEN W H, et al. The cognitive profile of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis[J]. Amyotroph Lateral Scler, 2010, 11(1-2):27-37. DOI:10.3109/17482960802645008.
- [79] CASTELLANOS-MONTIEL M J, CHAINEAU M, DURCAN T M. The neglected genes of ALS: cytoskeletal dynamics impact synaptic degeneration in ALS[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 594975. DOI: 10.3389/fncel.2020.594975.
- [80] SELLIER C, CAMPANARI M L, JULIE CORBIER C, et al. Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death[J]. EMBO J, 2016, 35(12): 1276-1297. DOI:10.15252/embj.201593350.
- [81] TAYLOR J P, BROWN R H, CLEVELAND D W. Decoding ALS: from genes to mechanism[J]. Nature, 2016, 539(7628):197-206. DOI:10.1038/nature20413.
- [82] GERBINO V, KAUNGA E, YE J, et al. The loss of TBK₁ kinase activity in motor neurons or in all cell types differentially impacts ALS disease progression in SOD1 mice[J]. Neuron, 2020, 106(5):789-805.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.03.005.
- [83] GURNEY M E, PU H, CHIU A Y, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation[J]. Science, 1994, 264(5166):1772-1775. DOI:10.1126/science.8209258.
- [84] CHOU S M, WANG H S, KOMAI K. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study[J]. J Chem Neuroanat, 1996, 10(3-4): 249-258. DOI: 10.1016/0891-0618(96)00137-8.
- [85] BENDOTTI C, TORTAROLO M, SUCHAK S K, et al. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels[J]. J Neurochem, 2001, 79(4): 737-746. DOI:10.1046/j.1471-4159.2001.00572.x.
- [86] PHILIPS T, ROBBERECHT W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(3): 253-263. DOI:10.1016/s1474-4422(11)70015-1.
- [87] PHILIPS T, ROTHSTEIN J D. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 69: 5.67.1-5.67.21. DOI: 10.1002/0471141755.ph0567s69.
- [88] NIAKAN K K, HAN J N, PEDERSEN R A, et al. Human pre-implantation embryo development[J]. Dev Camb Engl, 2012, 139(5): 829-841. DOI: 10.1242/dev.060426.
- [89] HASSOLD T, HUNT P. To err (meiotically) is human: the *Genesis* of human aneuploidy[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(4):280-291. DOI:10.1038/35066065.
- [90] GROPP A, WINKING H, HERBST E W, et al. Murine trisomy: developmental profiles of the embryo, and isolation of trisomic cellular systems[J]. J Exp Zool, 1983, 228(2):253-269. DOI:10.1002/jez.1402280210.
- [91] BAKER D J, JEGANATHAN K B, CAMERON J D, et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice[J]. Nat Genet, 2004, 36(7):744-749. DOI:10.1038/ng1382.
- [92] LAVON N, NARWANI K, GOLAN-LEV T, et al. Derivation of euploid human embryonic stem cells from aneuploid embryos[J]. Stem Cells, 2008, 26(7): 1874-1882. DOI:10.1634/stemcells.2008-0156.
- [93] BOLTON H, GRAHAM S J L, VAN DER AA N, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential[J]. Nat Commun, 2016, 7:11165. DOI:10.1038/ncomms11165.
- [94] DAVISSON M T, SCHMIDT C, AKESON E C. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome[J]. Prog Clin Biol Res, 1990, 360:263-280.
- [95] 赵国屏. 从人类基因组计划到精准医学——比较医学的发展趋势与挑战[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1):1-8. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.022.
(收稿日期: 2021-08-27 修回日期: 2021-09-24)