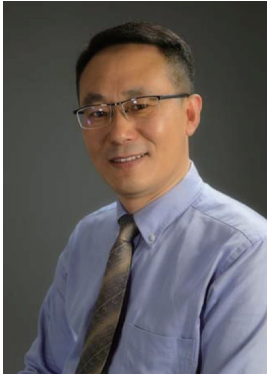


DOI: 10.13376/j.cblls/2022138

文章编号: 1004-0374(2022)10-1240-10



孙强, 研究员, 博士生导师, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心/神经科学研究所非人灵长类研究平台主任。国家杰出青年基金获得者, 科技部中青年科技创新领军人才、中组部“万人计划”入选者, 荣获2018年谈家桢生命科学创新奖, 2019年国务院政府特殊津贴, 2020年药明康德生命化学研究学者奖。中国实验动物学会灵长类实验动物专业委员会常务理事、上海市实验动物学会理事、上海市实验动物学会生物安全专业委员会委员。

一直致力于实验动物管理和模式动物构建及相关技术的研发工作。2005年博士毕业后作为973项目子课题“猴生殖生理和转基因猴构建研究”负责人, 开始从事非人灵长类研究工作, 并于2007年获得中国首批“试管食蟹猴”(PNAS, 2008)。2009年入职神经所负责筹建非人灵长类研究平台, 经过几年建设和发展先后建立了基于慢病毒转染的转基因猴构建技术, 并获得了具有人自闭症表型的转基因猴(Nature, 2016); 建立了基于食蟹猴精巢异种移植和激素注射的成熟加速技术, 缩短了雄性食蟹猴的性成熟时间(Cell Research, 2016; Natl Sci Rev, 2021); 建立并优化了基于CRISPR/Cas9和单碱基编辑系统的大小鼠和食蟹猴基因编辑技术, 并得到了基因敲出和敲入动物模型(Cell Research, 2017&2018; Nature Communication, 2018; Natl Sci Rev, 2019a; Molecular Therapy, 2022); 建立了基于第一极体置换的非人灵长类核质置换技术(Cell Research, 2020); 为解决现有非人灵长类模式动物构建所面临的嵌合、脱靶、复杂遗传操作困难、遗传背景不均一和传代时间长等缺陷, 带领团队经过5年的攻关, 在国际上首次建立非人灵长类体细胞克隆技术(Cell, 2018), 并进一步利用该技术成功构建世界上首批节律紊乱BMAL1基因敲除克隆猴(Natl Sci Rev, 2019b)。

## 基于基因编辑技术的非人灵长类动物模型构建

陈红玉, 刘真, 孙强\*

(中国科学院神经科学研究所, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 神经生物学国家重点实验室, 中国科学院灵长类神经生物学重点实验室, 上海200031)

**摘要:** 非人灵长类疾病模型在生命科学和生物医药领域具有非常重要的地位。近年来, 随着经典的靶向核酸酶(ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9)基因编辑技术的出现, 科学家已经成功获得了多种人类疾病相关的非人灵长类模型。该文首先介绍了经典基因编辑技术和以此为基础开发的单碱基编辑(base editing, BE)以及先导编辑(prime editing, PE)技术的研究进展, 随后对近年来通过不同基因编辑技术获得的非人灵长类疾病模型进行了综述, 最后对目前已获得的和正在构建的非人灵长类模型的管理、保种以及动物伦理和福利等方面进行了展望。

**关键词:** 非人灵长类动物模型; 基因编辑; CRISPR/Cas9; 单碱基编辑(BE); 先导编辑(PE)

中图分类号: Q78

文献标志码: A

收稿日期: 2022-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31825018, 82021001, 2021ZD020900); 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB32060100); 临港实验室重点任务资助项目(LG202106-01-01, LG202106-02-01)

\*通信作者: E-mail: qsun@ion.ac.cn

# Construction of non-human primate models based on gene editing technology

CHEN Hong-Yu, LIU Zhen, SUN Qiang\*

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

**Abstract:** Non-human primate disease models have a very important position in the fields of life sciences and biomedicine. In recent years, with the advent of classical targeted nuclease (ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9) gene editing technologies, scientists have successfully obtained a variety of human disease-related non-human primate models. This paper firstly introduces the research progress of classical gene editing technology and single base editing (BE) and prime editing (PE) technology developed based on CRISPR/Cas9, subsequently, the non-human primate disease models obtained by different gene editing techniques in recent years were reviewed, and finally, the management, conservation, animal ethics and welfare of the non-human primate models that have been obtained and are being constructed are prospected.

**Key words:** non-human primate models; gene editing; CRISPR/Cas9; base editing (BE); prime editing (PE)

非人灵长类动物 (non-human primates, NHPs) 是指除人以外的灵长类动物, 它们具有许多与人类相似的生物学特征, 如发达的大脑、复杂的社会行为、丰富的视觉感知和强大的物体分辨能力等, 具有解决人类相关疾病问题的独特优势, 在疾病发病机理、治疗策略以及治疗药物开发上都具有重要的地位<sup>[1]</sup>。然而, 与人类疾病相关的非人灵长类动物模型难以自发突变的方式获得, 因此, 利用基因编辑的办法高效地构建基因修饰动物模型对人类相关疾病的研究至关重要。由于较长的性成熟周期以及较低的生育率, 利用传统转基因法构建非人灵长类动物模型非常缓慢。CRISPR/Cas9 基因编辑技术的开发为可控的基因组改造提供了高效、快速而又廉价的基因操作工具。

随着以 CRISPR 系统为主的基因编辑技术日趋成熟, 如何将其运用于临床治疗将成为未来生命科学领域研究的焦点, 而非人灵长类疾病模型作为转化医学的桥梁, 在疾病治疗方面将发挥独特的作用。随着应用的深入, 更多安全高效的基于 CRISPR 的基因编辑工具将被开发出来, 也会有更多非人灵长类动物模型被成功构建。本文就基因编辑技术的研究进展以及在非人灵长类疾病模型构建中的应用等方面进行了简要概述。同时, 随着非人灵长类动物模型的数量和种类增加, 本文也对其管理、保种以及规范的使用进行了展望。

## 1 基因编辑工具的研究进展

最早的基因编辑技术是利用化学法或同源重组法来实现的<sup>[2-3]</sup>。同源重组法主要是基于核酸互补

配对的原则以及内含子自剪切的方法来改造核酸序列。虽然这些技术因为效率低下、特异性差, 并没有得到广泛的关注和使用, 但是为后续基于碱基配对进行位点特异性基因编辑技术的开发奠定了基础。

### 1.1 经典基因编辑工具

随着生物科学的进步, 一种被称为“人工核酸酶”的技术已经被广泛应用于细胞以及动物个体的基因组编辑。目前常用的核酸酶系统包括 3 种: 锌指核酸酶 (ZFNs) 系统、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs) 系统和规律成簇的间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统 (图 1)。ZFNs 系统的设计和筛选难度大, 并且锌指蛋白容易发生错配, 不仅效率低, 而且周期长, 目前还没有在非人灵长类中应用的报道。TALENs 的编码序列中部包含一段很长的串联排列的重复序列, 这段 DNA 序列编码的氨基酸能特异性识别并结合到特定碱基上, 比 ZFNs 结合 DNA 序列更稳定, 但是针对不同的靶标需要设计不同的 TALENs 序列, 很不经济便捷。在 TALENs 之后, CRISPR 系统快速发展, 它由 CRISPR 基因座转录出的 RNA 以及上游的 Cas 蛋白两个部分组成, 针对不同的编辑位点只需要改变 sgRNA 的序列, 在构建上方便快捷, 还能实现对多个位点同时进行编辑<sup>[4-6]</sup>。

虽然 ZFNs、TALENs 和 CRISPR 核酶本身的特征差别比较大, 但是它们发挥基因编辑功能利用了共同的工作原理。核酶先结合到靶标 DNA 位点, 对靶标进行切割产生 DNA 双链断裂损伤 (DNA double strand breaks, DSBs), 随后基因组自身的损伤应答反应被激活<sup>[7-11]</sup>。核酶诱导产生的 DSBs 主

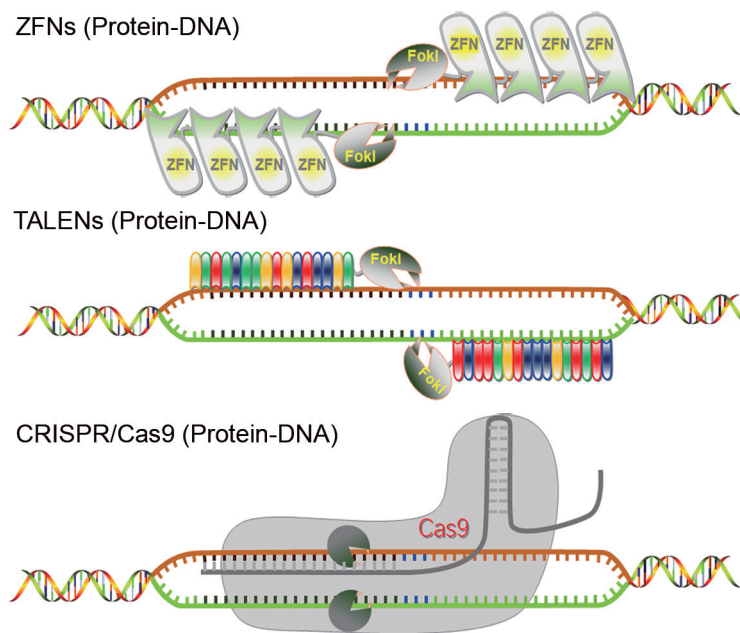


图1 ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9基因编辑工具示意图

要通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)、同源重组 (homologous recombination, HR) 以及微同源末端连接 (microhomolog-mediated end joining, MMEJ) 等途径来修复。基于不同的 DSBs 损伤修复途径以及不同的修复机器会产生不一样的基因编辑类型，具体分子机制如下所述。

NHEJ 是一种相对简单的修复方式，首先 Ku70/Ku80 异二聚体识别并结合至 DSBs 位点，拉近断裂末端并且募集下游 DNA-PKcs 激酶<sup>[12]</sup>，随后断裂的末端可能会被核酶 (如 Artemis) 或 DNA 聚合酶 (如 Pol $\mu$ ) 等加以“打磨”，生成可兼容的末端<sup>[13]</sup>，最后在连接复合物 (DNA ligase IV、XRCC4 等) 作用下将损伤的末端直接相连<sup>[14-15]</sup>。这是一种容易发生错误的损伤修复方式，在细胞周期各个阶段中都能发生，但主要发生在 G<sub>1</sub> 期。断端的随机连接可能会产生脱氧核苷酸的插入或缺失 (insertion or deletion, Indel)，最终导致基因敲除<sup>[16-17]</sup>。HR 是一种相对比较复杂但不易出错的修复方式，主要发生在 S 和 G<sub>2</sub> 期<sup>[17]</sup>。HR 修复起始于 DSBs 末端的剪切，由 MRN (MRE11-RAD50-NBS1) 复合物和 CtIP 以及其他外切核酸酶共同完成，产生 3' 单链 DNA (ssDNA)。ssDNA 迅速被单链结合蛋白 RPA 结合，随后重组酶 RAD51 在 BRCA2 的介导下代替 RPA，形成核蛋白纤维寻找并入侵其同源链，以同源链为模板合成新链，精确地修复损伤的 DNA<sup>[18]</sup>。HR 能通过供体 DNA 模板或同源重组的寡核苷酸 (ssODN)

实现精确的基因编辑。除了 NHEJ 和 HR 以外，模板 DNA 的靶向结合还可以通过 MMEJ 途径来完成，其与 HR 相似，能向基因组中插入长的外源 DNA<sup>[19]</sup>。MMEJ 主要利用损伤区域的微同源片段 (2~25 bp) 发生退火反应，将断裂的 DNA 重新连接在一起<sup>[20]</sup>。MMEJ 修复 DSBs 损伤常会造成连接处发生微同源片段的缺失，甚至导致基因重排，造成基因的敲除。研究表明，MMEJ 途径存在于植物、细菌、人类等多种类型细胞中，同时 MMEJ 途径也被应用在对哺乳动物细胞、斑马鱼和青蛙胚胎定向插入外源性供体 DNA 的研究中<sup>[21-23]</sup>。

## 1.2 单碱基编辑工具

越来越多的证据表明，CRISPR/Cas9 会造成基因组 DNA 片段的 Indel、易位和碎裂，这是由 Cas9 切割产生的 DSBs 引起的。因此，研究人员对 CRISPR/Cas9 系统进行了多种改良，以不依赖 DSBs 的方式开发新型基因编辑工具。David R. Liu 团队<sup>[24-27]</sup>于 2016 年开发的单碱基编辑器 (base editor, BE) 为基因编辑开辟了新的方向 (图 2)。目前有两种主要的 DNA 单碱基编辑，即胞嘧啶碱基编辑 (cytidine base editor, CBE)<sup>[24]</sup> 和腺嘌呤碱基编辑 (adenine base editor, ABE)<sup>[26]</sup>。这两种碱基编辑器目前可以实现所有嘧啶到嘧啶以及嘌呤到嘌呤的碱基转换。因为大多数已知的天然脱氨酶作用于 RNA，少数作用于 DNA 的例子也只是对单链 DNA (ssDNA) 有效<sup>[28]</sup>，所以 CBE 和 ABE 在设计上是利用催化活性被破坏的 Cas



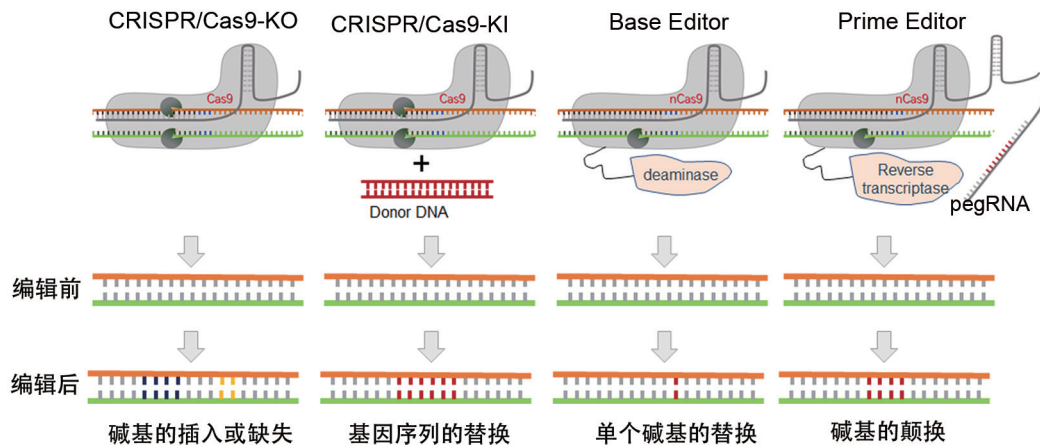


图2 不同的基因编辑工具可实现不同的基因编辑需求

核酶在 sgRNA 的引导下结合到靶标 DNA 链, 导致含有 PAM 的 DNA 链形成一个 R 环<sup>[29-30]</sup>, 使脱氨酶在 R 环处的 ssDNA 上进行有效的脱氨反应。

CBE 可实现 C 到 T 的高效碱基转变, 主要由 sgRNA、Cas9 蛋白和胞嘧啶脱氨酶 3 个原始组件构成。胞嘧啶脱氨酶与 Cas9 蛋白 (nCas9/Cas9n) 融合形成复合体, 在 sgRNA 的引导下结合到基因组位点, 在特定窗口内将非互补链上的胞嘧啶 (C) 脱氨基形成尿嘧啶 (U), 再通过 DNA 的复制 / 修复过程形成胸腺嘧啶 (T), 最终实现由 C·G 到 T·A 的置换。ABE 工具能够将 A·T 置换为 G·C, 它的原理与 CBE 类似, 但是用腺苷脱氨酶代替胞苷脱氨酶<sup>[26]</sup>。ABE 工具开发的主要障碍是缺乏已知的可作用于 ssDNA 的天然腺嘌呤脱氨酶<sup>[31]</sup>, 并且最初在 HEK293T 细胞中未观察到 A·T 到 G·C 的编辑<sup>[26]</sup>。因此, 科研人员来自大肠杆菌的 tRNA 特异性腺苷脱氨酶 TadA 进化, 产生一种具有活性的 eTadA\*, 并将其作为 ABE 中的腺苷脱氨酶。

SNP 是导致人类遗传疾病的最常见的突变类型。碱基编辑可以修正 70% 以上的疾病相关 SNP, 并且避免了由 Cas9 核酶引起的 p53 激活, 将 DSBs 的不良后果降至最低<sup>[32]</sup>。然而, BE 必须在约 4~10 个核苷酸的狭窄窗口内区分目标碱基和周围的碱基, 因此很容易导致旁边的胞嘧啶或者腺嘌呤发生脱氨<sup>[33]</sup>。与传统的基因编辑一样, 碱基编辑的另一个潜在问题是脱靶效应。近年来, 全球多个实验室针对 BE 进行了优化, 包括中科院脑科学与智能技术卓越创新中心杨辉、上海科技大学的陈佳、华东师范大学的李大力、中科院遗传发育所的高彩霞、哈佛大学的 J. Keith Joung 和韩国首尔大学的 Jin-Soo

Kim 等多个著名团队。

### 1.3 先导编辑工具

虽然 BE 能够实现碱基之间的转换, 但是实现不了碱基从嘧啶到嘌呤之间的颠换。2019 年, David R. Liu 团队<sup>[34]</sup>通过将 CRISPR 与逆转录酶结合在一起, 开发了一种被称为先导编辑 (prime editing, PE) 的全新精准基因编辑工具。PE 在不引入 DSBs 以及供体 DNA 模板的情况下就能够介导靶标基因组位点的定向插入、删除和以及所有 12 种可能的碱基之间的转换或颠换 (图 2)。PE 由连接到逆转录酶的 nCas9 (H840A) 和 pegRNA 两个部分组成。pegRNA 不仅结合特定的 DNA 序列, 还包含新的遗传信息作为模板来合成新的 DNA 链。在 pegRNA 的引导下, 编辑工具首先与特定的目标 DNA 序列结合, Cas9 的 RuvC 核酸酶结构域切割含有 PAM 的 DNA 链。为了将编辑后的序列从 pegRNA 转移到目标 DNA, 逆转录酶读取 RNA 并将相应的碱基连接到切口 DNA 的末端, 然后 DNA 修复机器将新链引入目标位点。

PE 理论上可以纠正与人类遗传疾病相关的大多数基因突变, 没有编辑窗口的限制, 可以实现任意碱基的转换或颠换、小片段 DNA 的插入和删除, 具有高度特异性和低脱靶率, 为临床治疗中的基因组编辑奠定了基础<sup>[34]</sup>。尽管 PE 已成功应用于人类细胞系及原代有丝分裂后小鼠皮层神经元, 但编辑效率因未知因素而异。进一步了解影响 PE 效率的因素将有助于提高 PE 应用的能力和范围。

## 2 非人灵长类疾病模型研究现状

常用的非人灵长类实验动物主要包括食蟹猴、

恒河猴及绒猴。随着基因编辑技术的不断发展,科学家们已经能够成功地修改非人灵长类动物的遗传信息并创造新的特征。目前,基于胚胎时期基因敲除(knock-out, KO)、单碱基编辑(BE)、基因敲入(knock-in, KI)以及基于体细胞基因编辑等方法,科学家们已经获得了多种类型基因修饰的疾病模型猴。

## 2.1 基于胚胎KO构建的非人灵长类模型

自TALENs技术开发以来,在斑马鱼<sup>[35]</sup>、蝶螈<sup>[36]</sup>和小鼠<sup>[37]</sup>等动物上都成功地实现了基因编辑,并且在小鼠上也能实现生殖系的传递。近年来,TALENs技术在非人灵长类上也得到了广泛的应用。*MeCP2*是一个位于X染色体上的纯合致死基因,对哺乳动物的学习记忆能力有着重要的影响,与Rett综合征(RTT)和自闭症谱系障碍(ASD)高度相关。2014年,昆明理工大学季维智教授团队<sup>[38]</sup>利用TALENs质粒注射食蟹猴受精卵,首次成功构建了*MeCP2*基因突变的猕猴和食蟹猴模型,并且验证发现基因组内并没有脱靶和随机整合的情况。同年,中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心孙强与仇子龙团队<sup>[39]</sup>共同合作,利用TALENs mRNA注射食蟹猴胚胎并移植,获得了一只*MeCP2*突变的雄性食蟹猴,但是可能由于这个致病位点的性别特殊性,雄性猴出生后不久就夭折了。此外,Chen等<sup>[40]</sup>在2017年利用TALENs靶向食蟹猴*MeCP2*基因,成功获得了RTT疾病猴模型,该猴具有跟临床患者极为相似的特征,如社交障碍、刻板行为以及睡眠障碍等。*MCPHI*基因与人类大脑的进化有关,*MCPHI*突变会导致小头畸形并伴有智力迟钝。2016年,中山大学的项鹏团队与国内多家单位<sup>[41]</sup>共同合作,利用特定靶标的TALEN mRNA注射猕猴胚胎,经过移植后出生了携带双亲*MCPHI*突变的基因修饰疾病模型猴。*MCPHI*突变猴与正常猴相比头围明显减小、染色体早凝(PCC)、胼胝体发育不良和上肢痉挛,再现了大多数患者身上的临床特征。此外,在*MCPHI*突变的皮肤成纤维细胞中再表达正常MCPHI蛋白,可以拯救PCC。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是人类最常见的神经退行性疾病,早期表现为记忆缺陷,随后表现为认知功能的下降。大多数引起AD的家族性突变存在于*PSENI*基因中,通常*PSENI*基因的外显子9缺失突变或者是外显子9的3'剪接位点发生点突变会导致显性遗传的家族性AD<sup>[42]</sup>。2021年,日本科学家使用TALENs核酶破坏猕猴的*PSENI*基因中

外显子9的3'剪接位点,从新生猕猴中获得的成纤维细胞表现出PS1内蛋白水解的扰动以及A $\beta$ 42/A $\beta$ 40产生的比率增加,这些是家族性AD发病的重要特征。这是世界上首次获得非人类灵长类动物家族性AD模型<sup>[43]</sup>。

自2013年CRISPR系统被开发以来,因其操作门槛低,迅速替代TALENs技术,被广泛应用到非人灵长类疾病模型的构建中。2014年,国内科学家通过胚胎显微注射靶向多个基因位点(*Ppar- $\gamma$* 、*Ragl*和*Dax1*)的sgRNA,成功获得*Ppar- $\gamma$* 和*Ragl*两个基因双敲的食蟹猴模型<sup>[44]</sup>。有趣的是,研究人员在健康出生的后代中并没有发现*Dax1*位点的编辑,但是在移植后未足月的胎儿中看到了*Dax1*位点发生了广泛的修饰。在一个雄性胎猴中,*Dax1*的靶向突变存在于大多数体细胞组织和性腺中,导致睾丸退化和肾上腺皮质异常发育。患有*DAX1*突变的人类会出现一种X连锁遗传性综合征,即先天性肾上腺发育不良(AHC)。患者通常在婴儿期出现肾上腺功能不全,后来由于与无精子症相关的性腺功能低下(HH)而无法进入青春期<sup>[45]</sup>。这只*Dax1*突变的雄性胎猴再现了人类AHC和HH疾病症状,为使用CRISPR/Cas9通过靶向基因组工程获得人类疾病的猴子模型提供了原理证明<sup>[46]</sup>。*P53*基因在肿瘤发生以及其他人类疾病中具有重要的调节功能。国内科学家通过在受精卵中注射靶向*p53*的优化后的Cas9/sgRNA组合,一次性获得了*p53*双等位基因突变的食蟹猴,体现了在猴子胚胎中进行HR驱动的精确基因编辑的可行性,可用于构建更稳定可靠的人类遗传缺陷的非人灵长类疾病模型。抗肌萎缩蛋白(Dys)主要分布于心肌和骨骼肌细胞,可以保护肌细胞膜在肌肉收缩时不受损伤。*Dys*基因突变会引起杜氏肌萎缩症(DMD)。将Cas9 mRNA和靶向*Dys*基因的sgRNA注射进猕猴胚胎中,构建出DMD疾病模型猴,发现在雄性和雌性猴子中都能成功诱发突变,并且早期的DMD症状伴随着明显的Dys蛋白水平降低以及肌肉的退化<sup>[47]</sup>。昼夜节律失调会导致身体功能障碍和疾病,如睡眠障碍、代谢疾病、心血管疾病、免疫疾病和肿瘤、出生缺陷和生殖问题,以及神经和精神疾病<sup>[48-49]</sup>。然而,关于昼夜节律系统如何影响这些疾病或昼夜节律调节成分等知之甚少。2019年,中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心孙强与张洪钧团队合作使用CRISPR/Cas9技术建立了*BMALI*(一个关键的昼夜节律成分)敲除的猕猴模型<sup>[50]</sup>,随后通过体细胞核



移植 (SCNT) 技术克隆了 *BMAL1* 修饰的食蟹猴<sup>[51]</sup>。将靶向 *BMAL1* 外显子 13 和 8 的 sgRNA 分别显微注射到食蟹猴受精卵中并移植, 基因型鉴定得到 2 只雄性和 1 只雌性的 *BMAL1* 敲除模型猴, 昼夜节律调节的关键成分, 如 PER1、PER2、CRY1 和 CRY2 在这些敲除猴中都被下调<sup>[50]</sup>。与野生型对照相比, 基因敲除猴夜间活动升高, REM (快速眼动)、NREM (非快速眼动) 和总睡眠减少<sup>[50]</sup>。这是首次建立 *BMAL1* 基因敲除的非人类灵长类动物模型, 将有助于阐明生物节律失常衍生疾病的新机制, 并为其开发新的治疗方法。Phelan-McDermid 综合征与 *SHANK3* 基因的突变或破坏高度相关。研究人员利用 CRISPR/Cas9 介导食蟹猴 *SHANK3* 基因突变。体细胞基因型分析以及脑活体证实了 *SHANK3* 基因发生了突变并且 *SHANK3* 蛋白水平降低。突变体表现出睡眠障碍、运动障碍和重复行为增加, 以及社交和学习障碍。总之, *SHANK3* 突变的食蟹猴模型表现出了自闭症谱系障碍和 Phelan-McDermid 综合征的显著特征<sup>[52]</sup>。*PINK1* 基因的突变会导致人类早发性帕金森病 (PD) 和选择性神经退行性变。研究人员将整合优化后的靶向 *PINK1* 基因的 CRISPR/Cas9 系统注射到食蟹猴受精卵中并移植, 在三只新生猴中实现了对目标位点精确有效的基因编辑, 突变猴成纤维细胞中 *PINK1* 的移码突变导致 mRNA 减少。研究表明, 将 Cas9 (D10A) 切口酶 mRNA 和截短的 sgRNA (都被证明能够降低脱靶的效率, 提高靶标基因的特异性) 共同注射到单细胞食蟹猴胚胎中, 可以成功构建非人灵长类的 PD 疾病模型<sup>[53]</sup>。

## 2.2 基于胚胎BE构建的非人灵长类模型

哈钦森-吉尔福德早衰症综合征 (HGPS) 是一种导致过早衰老的罕见疾病, 通常由 *LMNA* 基因中的从头点突变引起。由 CRISPR/Cas9 切口酶融合的胞苷脱氨酶组成的胞嘧啶碱基编辑器 (CBE) 能够高效地诱导 C 到 T 的碱基转换。研究人员通过向猴子受精卵中显微注射靶向 *LMNA* 基因的 CBE mRNA 和 sgRNA, 首次成功构建了 HGPS 疾病模型猴, 该模型表现出了生长迟缓、骨骼改变和血管异常等早老症状<sup>[54]</sup>。*STXBPI* 基因杂合突变会导致幼儿期的 *STXBPI* 脑病, 主要症状为智力障碍和癫痫。2022 年, 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心孙强、刘真和上海科技大学黄行许团队共同合作, 通过单碱基编辑技术靶向 *STXBPI* 基因, 成功构建了早发癫痫性脑病食蟹猴模型。该模型在基因、细胞、脑电活动、行为、药物干预等方面都再现了人类病患

典型的临床特征。该模型的建立也为后续的疾病机理研究、干预手段探索、药物测试等提供了新的工具<sup>[55]</sup>。常见的多基因疾病是由多种遗传变异造成的复合风险导致的, 这意味着疾病建模和基因治疗需要同时校正或引入多个单核苷酸变异。华南农业大学动物医学院杨世华和美国麻省理工学院冯国平团队共同合作, 在食蟹猴胚胎基因组中选择 11 个位点, 利用胞嘧啶和腺嘌呤碱基编辑器 (CBE/ABE), 针对单一或多个位点同时进行单碱基的精准突变, 通过胚胎移植技术首次获得 *FAH* 基因单碱基杂合突变食蟹猴胎儿。这一研究验证了单碱基编辑器在灵长类动物受精卵中多位点同时单碱基编辑的可能性, 以此来克服开发多基因疾病的灵长类模型所需繁殖时间漫长的缺点, 同时拓展了单碱基编辑器的应用, 为疾病的研究和临床前基因治疗提供重要佐证<sup>[56]</sup>。

## 2.3 基于胚胎KI构建的非人灵长类模型

*Cell Research* 杂志在 2018 年 1 月同时在线刊登了两篇来自中国科学家发表的论文, 报道了世界上首次获得的基因敲入的食蟹猴。第一篇由中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心孙强和杨辉团队共同合作完成。在杨辉团队之前开发的同源介导的末端连接 (HMEJ) 基因敲入策略基础上<sup>[57]</sup>, 通过一细胞胚胎注射编辑试剂首次成功地获得了基因靶向整合的食蟹猴。他们在 *Actb* 基因的 4 号内含子处插入 *Actb* (内含子 4-外显子 5)-p2A-mCherry 以实现 mCherry 在 *Actb* 启动子的控制下表达<sup>[58]</sup>。荧光观察两只新生猴脚趾发现能看见 mCherry 荧光。对两只死亡雌猴的各个组织进行切片观察, 发现尾巴、脚趾、心脏、肌肉、肾、大脑和卵巢均显示出不同嵌合程度的 mCherry 表达。基于其强大的 DNA 敲入效率和高保真性, HMEJ 介导的敲入策略为构建靶向基因修饰的猴模型提供了可能性。另一篇文章由昆明理工大学季维智、南京医科大学郭雪江与上海科技大学黄行许团队合作完成, 他们运用 CRISPR/Cas9 首次在食蟹猴中实现了 *Oct4-hrGFP* 基因敲入。由于 OCT4 是干细胞重编程中的重要转录因子, 该工作也为灵长类的相关重编程研究提供了一个很好的研究工具<sup>[59]</sup>。

近几年关于利用胚胎基因 KI 的方法构建非人灵长类疾病模型, 除了上述两个案例外, 并没有更多的报道, 归根结底是因为依赖于 HR 修复的基因 KI 的效率特别低。为了突破这一瓶颈, 科学家巧妙地利用 DSBs 修复的各个途径 (NHEJ、HR 和 MMEJ) 的特征和序列偏好, 开发了多种高效的基因 KI 策

略，比如：HITI<sup>[60-61]</sup>和KiBL<sup>[62]</sup>都是由基于NHEJ修复途径将外源供体片段整合至CRISPR/Cas9诱导的DSBs位点；单链寡聚核苷酸(ssODNs)<sup>[63]</sup>和Easi-CRISPR<sup>[64]</sup>等方法是基于HR修复途径介导的；CRIS-PITCh<sup>[23, 65]</sup>策略是依赖MMEJ修复途径介导的；而杨辉团队开发的HMEJ<sup>[57]</sup>基因敲入策略更是涉及到HR、NHEJ和MMEJ等三种修复途径，大大拓宽了该策略的使用范围。不仅如此，为了提高基因敲入的效率，科学家们还进行了诸多的尝试，如优化Cas9蛋白序列和结构、优化Cas9蛋白表达时长以及时期、优化sgRNA核苷酸序列的设计、对sgRNA和供体DNA序列进行不同的化学修饰、调节DSBs不同修复途径蛋白的表达以及小范围内调整靶标位点的染色质环境等，上述方法都能够或多或少地提升基因敲入的效率。以上方法的探索，都将为长片段基因敲入疾病工具猴模型的开发提供非常宝贵的经验。

#### 2.4 基于体细胞基因编辑构建的非人灵长类模型

主流的人类致病基因修饰的非人灵长类动物模型主要基于在受精卵中进行的转基因或者基因编辑操作构建，虽然这样的基因修饰猴模型具有非常重要的应用前景，但是构建成本高、成功率低、周期长、易产生嵌合体、脱靶，以及种群很小等问题极大的限制了模型猴的应用。为了打破这一限制，科学家将CRISPR系统和腺病毒或脂质纳米颗粒(LNP)等基因传递技术联合使用，基于体细胞基因编辑构建非人灵长类模型，近期也取得了重要的研究进展。

2020年，中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心仇子龙团队在青春期猕猴的海马体(DG和CA1-4)中通过AAV传递靶向基因编辑工具诱导了*MeCP2*基因突变。在*MeCP2*基因突变猴中发现了许多类似自闭症的行为异常，包括社交互动缺陷、睡眠模式异常、不敏感厌恶刺激、异常的手部动作和有缺陷的社会奖励行为。这些异常行为与用TALENs靶向食蟹猴胚胎*MeCP2*基因获得的突变猴模型类似<sup>[40]</sup>，表明通过腺病毒介导的对体内致病基因的编辑操作能直接导致青春期的灵长类动物的行为改变，为非人灵长类动物模型的快速生成铺平了道路<sup>[66]</sup>。脂质纳米颗粒(LNP)可以通过低密度脂蛋白受体(LDLR)将基因编辑货物递送至肝细胞。纯合子家族性高胆固醇血症(HoFH)是一种以完全或接近完全LDLR缺乏、血液低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平显著升高和过早发生动脉粥样硬化性心血管疾病为特征的遗传病。为了能够在HoFH患

者中进行体内肝脏基因编辑，科学家通过CRISPR/Cas9对*LDLR*基因进行体细胞敲除构建食蟹猴HoFH疾病模型，并且利用模型验证了GalNAc-LNP传递技术能够在HoFH猴模型中对肝脏基因进行有效的编辑<sup>[67]</sup>。此外，目前家族性高胆固醇血症通过长期及重复的使用抑制PCSK9或ANGPTL3的药物来治疗，任何一个基因功能丧失都会降低胆固醇并防止心脏病发作。科学家利用CRISPR腺嘌呤碱基编辑器mRNA和LNP包裹的靶基因sgRNA一起通过静脉注射进行体内递送，经鉴定可以有效且精确地修改同一活食蟹猴中的*PCSK9*和*ANGPTL3*基因，并降低相关基因的表达。这些数据为CRISPR单碱基编辑器同时精确作用于多个靶基因提供了经验，并提升了对家族性高胆固醇血症和心脏病发作进行多基因干预的前景<sup>[68]</sup>。不仅如此，广西医科大学赵永祥团队运用彩超引导经肝门静脉将CRISPR/Cas9系统导入食蟹猴的肝脏，实现了对肝细胞的抑癌基因*Pten*和*p53*直接进行编辑，产生更接近于人类体细胞基因突变的原发并转移性肝癌食蟹猴模型，这是全球首例体内原位基因编辑肝癌猴，为深入研究肝癌等恶性肿瘤病理机制、探索有效治疗干预方法提供了重要技术平台<sup>[69]</sup>。

综上所述，科学家已经利用TALENs和CRISPR等技术成功构建了多种人类疾病相关的非人灵长类动物模型(表1)，在脑疾病、血液疾病以及肿瘤的治疗策略和药物开发中发挥着重要的功能，由于篇幅的限制，非常抱歉还有很多非常好的工作没有办法一一列举。

### 3 问题与展望

随着基因编辑技术的进一步发展，越来越多的灵长类动物模型已经被成功构建，种类繁多的动物模型的选择对研究人员来说也是一个重大的挑战。标准化现有的以及正在开发的模型是克服这一挑战的重要方法。此外，随着灵长类动物模型种类及数量的不断增加，帮助管理这一巨大而宝贵的资源的工具开发至关重要。多年来，模型动物胚胎和精子的冷冻保存一直被广泛使用，可用于库存的存档、分发和群体管理。然而，如何能够更好地提高胚胎的存活率、体外受精的成功率以及如何更好地共享和改进保存它们的方法也是研究者们接下来需要深入思考的问题<sup>[70]</sup>。

现如今，全世界正在跨进使用非人灵长类动物进行研究的新时代的大门，而中国以其丰富的猴资

表1 利用基因编辑技术建立的非人灵长类动物模型

动物模型	基因名称	技术工具/修饰类型	模仿人类疾病	参考文献
猕猴和食蟹猴	<i>MeCP2</i>	TALENs/KO	RTT <sup>a</sup> 和ASD <sup>b</sup>	[38-40]
猕猴	<i>MCPH1</i>	TALENs/KO	PCC <sup>c</sup> 和小头畸形	[41]
狨猴	<i>PSEN1</i>	TALENs/KO	AD <sup>d</sup>	[42-43]
食蟹猴	<i>Ppar-γ/Rag1</i>	CRISPR/KO	—	[44]
食蟹猴	<i>DAX1</i>	CRISPR/KO	AHC <sup>e</sup> 和HH <sup>f</sup>	[44,46]
猕猴	<i>Dys</i>	CRISPR/KO	DMD <sup>g</sup>	[47]
猕猴	<i>BMAL1</i>	CRISPR+SCNT/KO	昼夜节律失调	[50-51]
食蟹猴	<i>SHANK3</i>	CRISPR/KO	Phelan-McDermid综合征	[52]
食蟹猴	<i>PINK1</i>	CRISPR/KO	PD <sup>h</sup>	[53]
食蟹猴	<i>LMNA</i>	CBE/碱基替换	HPGS <sup>i</sup>	[54]
食蟹猴	<i>STXBP1</i>	CBE/碱基替换	癫痫	[55]
食蟹猴	<i>FAH</i>	CBE+ABE/碱基替换	—	[56]
食蟹猴	<i>Actb</i>	CRISPR/KI-mcherry	—	[57-58]
食蟹猴	<i>Oct4</i>	CRISPR/KI-hrGFP	—	[59]
猕猴	<i>MeCP2</i>	CRISPR+AAV/转基因	ASD <sup>b</sup>	[66]
食蟹猴	<i>LDLR</i>	CRISPR+LNP/KO	HOFH <sup>j</sup>	[67]
食蟹猴	<i>PCSK9/ANGPTL3</i>	ABE+LNP/KO	HOFH <sup>j</sup>	[68]
食蟹猴	<i>Pten/p53</i>	CRISPR/KO	转移性肝癌模型	[69]

注: “a”, Rett 综合征; “b”, 自闭症谱系障碍; “c”, 染色体早凝; “d”, 阿尔茨海默病; “e”, 先天性肾上腺发育不良; “f”, 无精子症相关的性腺功能低下; “g”, 杜氏肌萎缩症疾病; “h”, 帕金森病; “i”, 哈钦森-吉尔福德早衰症综合征; “j”, 纯合子家族性高胆固醇血症

源和领域内相关研究经验, 目前正处于领先地位。随着胚胎干细胞囊胚注射、单倍体干细胞、生殖干细胞、体细胞核移植、非人灵长类动物加速性成熟等技术的不断改进, 以及随着重组腺病毒、LNP 以及其他更多安全高效的递送系统工具的逐步开发, 在这些前提基础上进一步联合 CRISPR/Cas 系统不仅可以飞速推进疾病模型猴的构建效率, 并且可能会实现工业化规模化的生产, 导致非人灵长类动物模型的使用范围扩大。在这里, 研究人员需要更多地考虑到基因修饰非人灵长类动物的伦理和福利问题<sup>[71-72]</sup>, 我们应当努力完善、减少甚至是取代它们的使用。目前已有的动物福利和伦理制度也要根据非人灵长类动物模型的具体使用范围和方式加以补充和完善, 对实验风险、成功概率以及潜在收益进行现实评估, 在最大化满足实验需求的基础上, 实现对动物的最小伤害。

### [参 考 文 献]

- [1] Chan AW. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research. *ILAR J*, 2013, 54: 211-23
- [2] Strobel SA, Dervan PB. Site-specific cleavage of a yeast chromosome by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Science*, 1990, 249: 73-5
- [3] Cho J, Parks ME, Dervan PB. Cyclic polyamides for recognition in the minor groove of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10389-92
- [4] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23: 720-3
- [5] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10: 957-63
- [6] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 153: 910-8
- [7] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333: 307
- [8] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326: 1501
- [9] Lo TW, Pickle CS, Lin S, et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. *Genetics*, 2013, 195: 331-48
- [10] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 230-2
- [11] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 397-405
- [12] Brandsma I, Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act.



- Genome Integr, 2012, 3: 9
- [13] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181-211
- [14] Koike M, Yutoku Y, Koike A. Cloning, localization and focus formation at DNA damage sites of canine Ku70. *J Vet Med Sci*, 2017, 79: 554-61
- [15] Brouwer I, Sitters G, Candelli A, et al. Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA. *Nature*, 2016, 535: 566-9
- [16] Kruminis-Kaszkiel E, Juranek J, Maksymowicz W, et al. CRISPR/Cas9 technology as an emerging tool for targeting amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 906
- [17] Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J*, 2016, 283: 1218-31
- [18] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [19] Safari F, Farajnia S, Ghasemi Y, et al. New developments in CRISPR technology: improvements in specificity and efficiency. *Curr Pharm Biotechnol*, 2017, 18: 1038-54
- [20] Bae S, Kweon J, Kim HS, et al. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat Methods*, 2014, 11: 705-6
- [21] Kim SI, Matsumoto T, Kagawa H, et al. Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat Commun*, 2018, 9: 939
- [22] Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Sci Rep*, 2015, 5: 8841
- [23] Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc*, 2016, 11: 118-33
- [24] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [25] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 2017, 168: 20-36
- [26] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-71
- [27] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 770-88
- [28] Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell*, 2002, 10: 1247-53
- [29] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935-49
- [30] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-29
- [31] Zheng Y, Lorenzo C, Beal PA. DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 3369-77
- [32] Newby GA, Yen JS, Woodard KJ, et al. Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature*, 2021, 595: 295-302
- [33] Kim HS, Jeong YK, Hur JK, et al. Adenine base editors catalyze cytosine conversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1145-8
- [34] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149-57
- [35] Hisano Y, Ota S, Kawahara A. Genome editing using artificial site-specific nucleases in zebrafish. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 26-33
- [36] Hayashi T, Sakamoto K, Sakuma T, et al. Transcription activator-like effector nucleases efficiently disrupt the target gene in Iberian ribbed newts (*Pleurodeles waltl*), an experimental model animal for regeneration. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 115-21
- [37] Qiu Z, Liu M, Chen Z, et al. High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e120
- [38] Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 323-8
- [39] Liu Z, Zhou X, Zhu Y, et al. Generation of a monkey with *MECP2* mutations by TALEN-based gene targeting. *Neurosci Bull*, 2014, 30: 381-6
- [40] Chen Y, Yu J, Niu Y, et al. Modeling Rett syndrome using TALEN-edited *MECP2* mutant cynomolgus monkeys. *Cell*, 2017, 169: 945-55 e10
- [41] Ke Q, Li W, Lai X, et al. TALEN-based generation of a cynomolgus monkey disease model for human microcephaly. *Cell Res*, 2016, 26: 1048-61
- [42] Le Guennec K, Veugelen S, Quenez O, et al. Deletion of exons 9 and 10 of the Presenilin 1 gene in a patient with early-onset Alzheimer disease generates longer amyloid seeds. *Neurobiol Dis*, 2017, 104: 97-103
- [43] Sato K, Sasaguri H, Kumita W, et al. A non-human primate model of familial Alzheimer's disease. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.08.24.264259
- [44] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836-43
- [45] Ponikwicka-Tyszko D, Kotula-Balak M, Jarzabek K, et al. The DAX1 mutation in a patient with hypogonadotropic hypogonadism and adrenal hypoplasia congenita causes functional disruption of induction of spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet*, 2012, 29: 811-6
- [46] Kang Y, Zheng B, Shen B, et al. CRISPR/Cas9-mediated Dax1 knockout in the monkey recapitulates human AHC-HH. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 7255-64
- [47] Chen Y, Zheng Y, Kang Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2015, 24: 3764-74
- [48] Bass JT. The circadian clock system's influence in health and disease. *Genome Med*, 2017, 9: 94
- [49] Yang G, Chen L, Grant GR, et al. Timing of expression of the core clock gene *Bmal1* influences its effects on aging

- and survival. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 324ra16
- [50] Qiu P, Jiang J, Liu Z, et al. BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders. *Natl Sci Rev*, 2019, 6: 87-100
- [51] Liu Z, Cai Y, Liao Z, et al. Cloning of a gene-edited macaque monkey by somatic cell nuclear transfer. *Natl Sci Rev*, 2019, 6: 101-8
- [52] Zhou Y, Sharma J, Ke Q, et al. Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques. *Nature*, 2019, 570: 326-31
- [53] Chen ZZ, Wang JY, Kang Y, et al. PINK1 gene mutation by pair truncated sgRNA/Cas9-D10A in cynomolgus monkeys. *Zool Res*, 2021, 42: 469-77
- [54] Wang F, Zhang W, Yang Q, et al. Generation of a Hutchinson-Gilford progeria syndrome monkey model by base editing. *Protein Cell*, 2020, 11: 809-24
- [55] Lu Z, He S, Jiang J, et al. Base-edited cynomolgus monkeys mimic core symptoms of STXBPI encephalopathy. *Mol Ther*, 2022, 30: 2163-75
- [56] Zhang W, Aida T, Del Rosario RCH, et al. Multiplex precise base editing in cynomolgus monkeys. *Nat Commun*, 2020, 11: 2325
- [57] Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2017, 27: 801-14
- [58] Yao X, Liu Z, Wang X, et al. Generation of knock-in cynomolgus monkey via CRISPR/Cas9 editing. *Cell Res*, 2018, 28: 379-82
- [59] Cui Y, Niu Y, Zhou J, et al. Generation of a precise Oct4-hrGFP knockin cynomolgus monkey model via CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination. *Cell Res*, 2018, 28: 383-6
- [60] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540: 144-9
- [61] Yamamoto Y, Gerbi SA. Making ends meet: targeted integration of DNA fragments by genome editing. *Chromosoma*, 2018, 127: 405-20
- [62] Cho HS, Park YK, Oh JH, et al. Proximal Tibia chondroblastoma treated with curettage and bone graft and cement use. *Orthopedics*, 2016, 39: e80-5
- [63] Wang Z, Zhou ZJ, Liu DP, et al. Double-stranded break can be repaired by single-stranded oligonucleotides via the ATM/ATR pathway in mammalian cells. *Oligonucleotides*, 2008, 18: 21-32
- [64] Miura H, Quadros RM, Gurumurthy CB, et al. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. *Nat Protoc*, 2018, 13: 195-215
- [65] Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun*, 2014, 5: 5560
- [66] Wu S, Li X, Qin D, et al. Induction of core symptoms of autism spectrum disorder by *in vivo* CRISPR/Cas9-based gene editing in the brain of adolescent rhesus monkeys. *Sci Bull*, 2021, 66: 937-46
- [67] Kasiewicz LN, Biswas S, Beach A, et al. Lipid nanoparticles incorporating a GalNAc ligand enable *in vivo* liver ANGPTL3 editing in wild-type and somatic LDLR knockout non-human primates. *bioRxiv*, [Epub ahead of print].
- [68] Bellinger A, Rhode E, Kathiresan S, et al. Sequential *in vivo* CRISPR base editing of the PCSK9 and ANGPTL3 genes in non-human primates. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79: 953
- [69] Cui Z, Tian R, Huang Z, et al. FrCas9 is a CRISPR/Cas9 system with high editing efficiency and fidelity. *Nat Commun*, 2022, 13: 1425
- [70] Zhong L, Huang Y, He J, et al. Generation of *in situ* CRISPR-mediated primary and metastatic cancer from monkey liver. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 411
- [71] Hart-Johnson S, Mankelov K. Archiving genetically altered animals: a review of cryopreservation and recovery methods for genome edited animals. *Lab Anim*, 2022, 56: 26-34
- [72] Prescott MJ. Ethical and welfare implications of genetically altered non-human primates for biomedical research. *J Appl Anim Ethics Res*, 2020, 2: 151-76