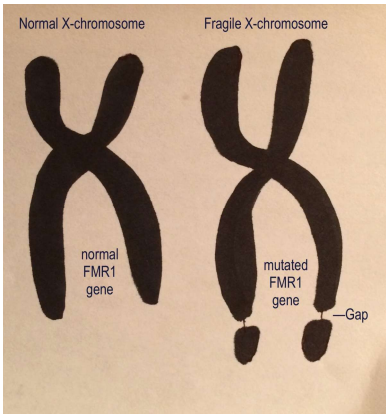
利用 Axion Maestro 研究修复脆性 X 染色体综合症神经元

脆性 X 染色体综合症及其病因

脆性 X 染色体综合症（Fragile X Syndrome，FXS）是男性智力障碍的最常见病因，在男性新生儿中的发病率约为 1/3600。该综合症还导致一些自闭症的表征，如社交和沟通障碍，注意力分散和多动症。目前尚无治愈这种疾病的方法。



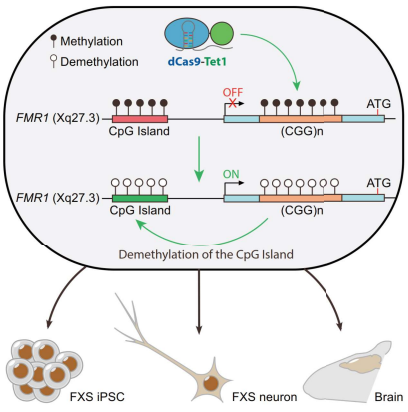
图一：脆性 X 染色体

这些疾病缺陷是由于大脑在发育过程中缺乏 FMR1 基因编码的 FMRP（脆性 X 染色体智力障碍蛋白）导致的。FMRP 是一种 RNA 结合蛋白，它在突触发育的蛋白合成过程中起到分子刹车的作用。有证据表明在病人来源的神经细胞中，由于缺乏 FMRP 导致了一些神经递质受体和离子通道过度表达和插入细胞膜，使得突触过度兴奋进而影响了一系列中枢神经系统中神经环路的正常功能。

FMR1 基因 5’ 端非编码区（UTR）存在一系列三核苷酸（CGG）重复，这些重复的长度决定了个体是否会发展出脆性 X 染色体综合征。众多证据表明，CGG 重复的扩增突变（大于 200 个），同时伴随着 DNA 超甲基化，导致了 FMR1 基因的启动子部位形成了异染色质结构，从而在 FXS 中“沉默”了 FMR1 基因的表达，但这一过程的分子机制尚未被充分理解。

利用 Axion Maestro 研究修复 FXS 神经元

Whitehead 研究所的研究人员建立了一个 CRISPR/Cas9 系统，在病人来源的诱导多能干细胞（iPSC）和其分化的神经细胞中去除 CGG 重复上（超过 450 个）的甲基化，使得 FMR1 基因的表达恢复到正常水平。这项研究发表在 2018 年 2 月的 Cell 杂志（图二，图三）。



图二：论文内容示意

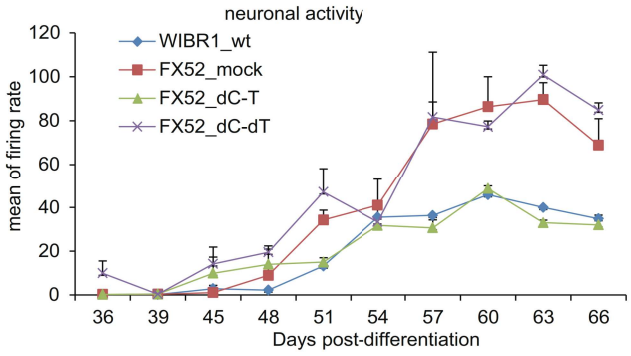
图三：难道忘了我们是在研究人类的疾病吗？

FXS 的小鼠模型由于种属特异性存在很大局限，比如利用 CRISPR/Cas9 去除甲基化不能恢复小鼠的神经细胞活性，在完全缺陷 CGG 的小鼠模型中也只能有限恢复神经细胞功能。

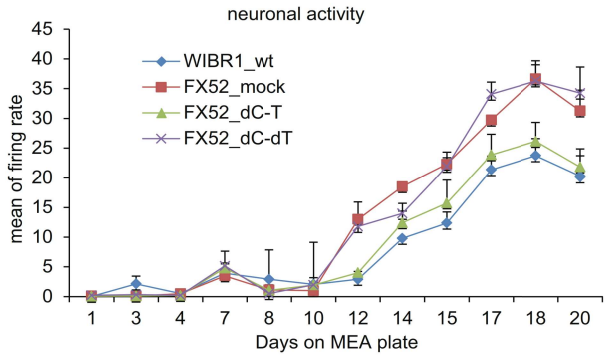
之后“修复”的神经元被移植到小鼠大脑中，FMR1 基因在神经元中保持活跃至少 3 个月，意味着纠正的甲基化在动物身上也许是可持续的。另外研究人员还证明了其 CRISPR/Cas9 系统没有明显的脱靶效应，提示了未来临床应用的前景。

其中利用 Axion MEA 设备，在 MEA 多孔板中培养经去甲基化编辑的病人来源 iPSC 及其他对照干细胞，分化至成熟，从第 36 天起检测放电活动直至第 66 天。实验证明了重新激活的 FMR1 基因修复了病人来源 iPSC 衍生的神经元，逆转了与该综合症相关的异常电活动（图四）。此外，利用 Axion MEA 设备研究人员还进一步对有丝分裂后的病人来源神经细胞进行去甲基化编辑，并和其他对照干细胞进行比较，发现针对已分化的神经细胞，去甲基化编辑也可以使疾病神经元的电活动恢复到与正常相当的水平（图五）。

“我们发现，这种疾病在神经元层面是可逆的，” Liu 说，“当我们从脆性 X 染色体综合征 iPS 细胞衍生的神经元中去除 CGG 重复的甲基化时，我们实现了 FMR1 的完全激活。” (1) (2)



图四：“过度兴奋”的病人来源神经元 iPSC（红色）经去甲基化基因编辑后（绿色）放电恢复到几乎与正常人来源的神经元一样（蓝色）



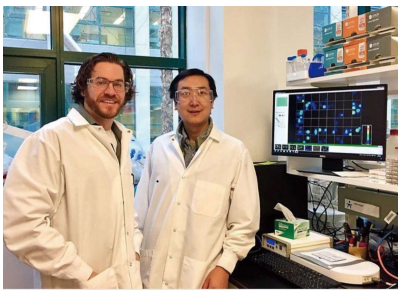
图五：“过度兴奋”的病人 iPSC 分化的神经元（红色）经去甲基化基因编辑后（绿色）放电恢复到几乎与正常人来源的神经元一样（蓝色）

Maestro MEA 的用途和优势

◆可高通量地在微量体积内，定量检测和比较神经细胞的活性和连接性，多种形式 MEA 多孔板可选。

◆非破坏性的胞外记录，能够从同一培养物中长期收集数据。

◆可在培养细胞中多个位置记录数据，用以研究神经网络的连接性和成熟性。



文章作者 John Graef,Hao Wu 和 Axion Maestro 的合影

（1）Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1Gene，Liu et al., 2018, Cell 172, 979–992 https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.012

（2）http://news.mit.edu/2018/mit-whitehead-fragile-x-syndrome-neurons-restored-crispr-0215

更多内容请访问：www.axionbiosystems.com
www.topbiox.com