

中国实验动物学会实验动物模型研发报告

实验动物模型名称 (中、英文)	<i>TBX6</i> 相关先天性脊柱侧凸 (TACS) 小鼠模型 <i>TBX6</i> associated congenital scoliosis (TACS) mouse model		
申请人(单位)名称	中国医学科学院北京协和医院		
研究机构(人)地址	北京市东城区帅府园一号		
研究机构(人)电话	13911071856		
主要研究者及单位	wuzh3000@163.com		
研究起止日期	2017年 1 月 至 2022 年 12 月		
原始资料的保存地点	中国医学科学院北京协和医院, 复旦大学		
联系人姓名	吴志宏	电话 13911071856	邮箱 wuzh3000@163.com
摘要(主要造模方法、与临床的相似度及评价方法)			
<p>申请人课题组采用CRISPR/Cas9技术建立符合<i>Tbx6</i>基因复合致病模式的小鼠模型(简称:TACS小鼠模型)。首先建立携带罕见突变位点小鼠品系:采用CRISPR/Cas9技术在FVB/NJ品系小鼠<i>Tbx6</i>基因第2号外显子区域插入一个碱基,造成该等位基因移码突变,形成与TACS患者携带罕见突变一致的基因型,基因型为<i>Tbx6</i>^{+/-}。进一步采用CRISPR/Cas9敲除<i>Tbx6</i>启动子区域部分碱基,形成启动子敲减模型,基因型为<i>Tbx6</i>^{mh/+}。通过两种小鼠品系(F1)的杂交,形成符合TACS基因型的F2代小鼠,基因型为<i>Tbx6</i>^{mh/-}。通过骨骼染色和MicroCT方法统计分析畸形比例和畸形部位分布,发现小鼠的椎体畸形全部集中于脊柱下段,与临床<i>TBX6</i>相关先天性脊柱侧凸(<i>TBX6</i>-Associated Congenital Scoliosis, TACS)患者队列的中观察到的表型和致病模式具有一致性。</p>			

中国实验动物学会动物模型研发报告编制要点

一、动物模型的命名

中文名:

*TBX6*相关先天性脊柱侧凸 (TACS) 小鼠模型

英文名:

TBX6 associated congenital scoliosis (TACS) mouse model

二、研究背景

先天性脊柱侧凸(Congenital Scoliosis, CS)是一种在胚胎发育期椎体发育异常导致脊柱侧方弯曲 $\geq 10^\circ$ 的先天性骨骼畸形疾病[1]。CS 具有进展快、畸形重、并发症多等特点,严重时可致患者瘫痪,是造成青少年残疾的主要疾病之一,给家庭和社会带来极大的负担。目前临床对于 CS 的治疗主要是支具矫形辅助治疗和脊柱手术治疗。CS 具有侧凸较僵硬、支具矫形效果欠佳等临床特点,通常手术切除病椎及椎体融合等手术是先天性脊柱侧凸患者最终的治疗方案,然而,CS 患者心肺功能差、手术风险较大、可能需要多次矫形,因此,临床外科手术治疗先天性脊柱侧凸常常具有极大的挑战,对于患者和家庭也是沉重的心理和经济负担[2,3]。如能对 CS 患者进行早期预测或干预,可从根本上预防和控制病情的发展。因此,建立 CS 疾病模型动物,探索先天性脊柱侧凸的发病机制和治疗靶点具有重要临床意义和社会效益。

申请人课题组所在团队于 2015 年在《New England Journal of Medicine》首次报道了 *TBX6* 基因变异所致先天性脊柱侧凸的一种非常重要的致病模式:*TBX6* 基因 null 突变联合常见 SNP 突变,即无效变异联合常见亚效等位基因变异[4]。*TBX6* 基因 null 突变联合常见 SNP 突变可造成 *TBX6* 基因表达剂量的进一步降低,对先天性脊柱侧凸的发生发展起着重要的作用。申请人团队研究证实该致病模式后,相继得到全世界范围内其他课题组不同人群的独立验证[5, 6],法国和日本的团队证明这一致病遗传模式在其他人群也具有相似的 CS 疾病表型及发病率,充分说明这一致病模式在不同遗传背景的 CS 患者人群中具有普遍性。

脊柱是由胚胎时期的体节发育而来,其发育过程受 Wnt、FGF 和 Notch 等信号通路调节。*TBX6* 基因是 NOTCH 信号通路的关键基因[7,8],在胚胎发育体节形成、神经管发育和胚层形成规范中具有重要作用,在人群中也发现 *TBX6* 基因

突变引起基因表达剂量下降,可能是导致脊椎肋骨发育不全(SCD)的发病机制[9]。发育机制研究认为 *TBX6*、*Mesp2*、*Ripply2* 等基因共同作用,参与脊椎动物体节信号振荡、发育的过程[10]。*TBX6* 作为体节发育关键的转录因子,通过调节 Notch 通路的基因转录,影响下游 *Dll1*、*Mesp2* 和 *Ripply2* 基因的表达来影响脊柱的发育[11]。此外, *TBX6* 基因具有剂量效应,不同突变导致 *TBX6* 基因表达量改变,其对脊柱畸形发病的贡献度随之不同[12,13]。总之,在体节形成的胚胎发育期, *TBX6* 基因发挥生物学作用的过程受到严格调控, *TBX6* 基因的致病突变会对其调控的信号网络产生影响。

目前对于 *TBX6* 基因的功能研究大多基于发育层面。*Deborah*[14]等通过胚胎干细胞内源性重组,敲除了起始的蛋氨酸和 T-box 的一部分来建立 *Tbx6* 的突变小鼠模型, *Tbx6^{tm1Pa}* (等位基因突变的杂合子)可以存活并且有生殖能力,没有其他异常表现,在杂合子相互交配产生的 94 个后代中没有发现纯合子的情况。在 *Tbx6* 突变的纯合小鼠胚胎中, E8.5 就可以观察到体节形成的异常,在 E9.5 和 E10.5 时出现尾牙增大并充满未分化的间充质细胞;之后在中央的神经管两旁,形成两个中央旁管,但二者官腔不规则,功能丧失,无法形成体节;同时,还能观察到体节形成的异常。在增大的尾牙和异常体节中,体节形成标志蛋白如 *DLL1*、*paraxia* 和 *Mox-1* 等表达异常[15]。这些都说明了 *TBX6* 基因在控制体节精确形成过程中的重要角色。然而在胚胎发育期,对于 *TBX6* 基因及其变异所致体节分化异常的转录调控作用仍旧不明确。

申请人团队通过建立 *TBX6* 基因复合遗传致病模式的基因编辑动物模型。验证了 *TBX6* 基因剂量模型和 TACS 临床表型的生物学基础,首次成功建立 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸的小鼠模型。

参考文献

1. Weiss HR, Moramarco M, Congenital Scoliosis (Mini-review). *Curr Pediatr Rev*, 2016; volume 12, Issue 1, Pages 43-47
2. Johal J, Loukas M, Fisahn C, Chapman JR, Oskouian RJ, Tubbs RS, Hemivertebrae: a comprehensive review of embryology, imaging, classification, and management. *Childs Nerv Syst*, 2016 Nov; volume 32, Issue 11, Pages 2105-2109
3. Eymard B, Stojkovic T, Sternberg D, Richard P, Nicole S, Fournier E, Behin A, Laforet P, Servais L, Romero N, Fardeau M, Hantai D, [Congenital myasthenic

syndromes: difficulties in the diagnosis, course and prognosis, and therapy--The French National Congenital Myasthenic Syndrome Network experience]. *Rev Neurol (Paris)*, 2013 Feb; volume 169 Suppl 1, Issue S45-S55

4. Fang PF, Hu RY, He XY, Ding XY, Multiple signaling pathways control *Tbx6* expression during *Xenopus* myogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004 Jun; volume 36, Issue 6, Pages 390-396
5. Wu N, Ming X, Xiao J, Wu Z, Chen X, Shinawi M, Shen Y, Yu G, Liu J, Xie H, Gucev ZS, Liu S, Yang N, Al-Kateb H, Chen J, Zhang J, Hauser N, Zhang T, Tasic V, Liu P, Su X, Pan X, Liu C, Wang L, Shen J, Shen J, Chen Y, Zhang T, Zhang J, Choy KW, Wang J, Wang Q, Li S, Zhou W, Guo J, Wang Y, Zhang C, Zhao H, An Y, Zhao Y, Wang J, Liu Z, Zuo Y, Tian Y, Weng X, Sutton VR, Wang H, Ming Y, Kulkarni S, Zhong TP, Giampietro PF, Dunwoodie SL, Cheung SW, Zhang X, Jin L, Lupski JR, Qiu G, Zhang F, *TBX6* null variants and a common hypomorphic allele in congenital scoliosis. *N Engl J Med*, 2015 Jan 22; volume 372, Issue 4, Pages 341-35018.
6. Takeda K, Kou I, Kawakami N, Iida A, Nakajima M, Ogura Y, Imagawa E, Miyake N, Matsumoto N, Yasuhiko Y, Sudo H, Kotani T, Nakamura M, Matsumoto M, Watanabe K, Ikegawa S, Compound Heterozygosity for Null Mutations and a Common Hypomorphic Risk Haplotype in *TBX6* Causes Congenital Scoliosis. *HUM MUTAT*, 2017 Jan 05; volume
7. Oginuma M, Niwa Y, Chapman DL, Saga Y, *Mesp2* and *Tbx6* cooperatively create periodic patterns coupled with the clock machinery during mouse somitogenesis. *DEVELOPMENT*, 2008 Aug; volume 135, Issue 15, Pages 2555-2562
8. White PH, Farkas DR, Chapman DL, Regulation of *Tbx6* expression by Notch signaling. *GENESIS*, 2005 Jun; volume 42, Issue 2, Pages 61-70
9. Chen W, Liu J, Yuan D, Zuo Y, Liu Z, Liu S, Zhu Q, Qiu G, Huang S, Giampietro PF, Zhang F, Wu N, Wu Z, Progress and perspective of *TBX6* gene in congenital vertebral malformations. *ONCOTARGET*, 2016 Aug 30; volume 7, Issue 35, Pages 57430-57441

10. Dunty WJ, Biris KK, Chalamalasetty RB, Taketo MM, Lewandoski M, Yamaguchi TP, Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation. DEVELOPMENT, 2008 Jan; volume 135, Issue 1, Pages 85-94
11. Chen YL, Liu B, Zhou ZN, Hu RY, Fei C, Xie ZH, Ding X, Smad6 inhibits the transcriptional activity of *Tbx6* by mediating its degradation. J BIOL CHEM, 2009 Aug 28; volume 284, Issue 35, Pages 23481-23490
12. Lefebvre M, Duffourd Y, Jouan T, Poe C, Jean-Marcais N, Verloes A, St-Onge J, Riviere JB, Petit F, Pierquin G, Demeer B, Callier P, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Thevenon J, Autosomal recessive variations of *TBX6*, from congenital scoliosis to spondylocostal dysostosis. CLIN GENET, 2016 Nov 08; volume
13. Chapman DL, Cooper-Morgan A, Harrelson Z, Papaioannou VE, Critical role for *Tbx6* in mesoderm specification in the mouse embryo. Mech Dev, 2003 Jul; volume 120, Issue 7, Pages 837-847
14. White PH, Chapman DL, Dll1 is a downstream target of *Tbx6* in the paraxial mesoderm. GENESIS, 2005 Jul; volume 42, Issue 3, Pages 193-202
15. Chapman DL, Papaioannou VE, Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. NATURE, 1998 Feb 12; volume 391, Issue 6668, Pages 695-697

三、动物模型的制备方法

3.1 实验材料

3.1.1 实验动物:

FVB/NJ 品系小鼠

3.1.2 主要试剂

- (1) CRISPR/Cas9 试剂盒: gRNA

表 1 小鼠基因组中单向导 RNA (sgRNA) 的靶序列

Location of target region	Sequences (5'-3')
Exon 2 of <i>Tbx6</i>	GAGGCCCTTCACTCGCTTCC
Conserved regulatory region in the <i>Tbx6</i> promoter	CCTAGGGATCAATCAGACCGAGG

(2) PCR 试剂盒及鉴定引物信息

表 2 小鼠 *Tbx6* 基因分型引物

Primer	Sequence
<i>Tbx6mh</i> -F	5'-CAAGCGTCAGAGAAGACCACCA-3'
<i>Tbx6mh</i> -R	5'-CCTTACCCAGAGCCAATCCAAC-3'
<i>Tbx6</i> -exon 2-F	5'-ATCCTCATTCTTCCCACATCTC-3'
<i>Tbx6</i> -exon 2-R	5'-ATGCCACCTCTTACAGTTTCT-3'

- (3) 异氟烷气体麻醉
- (4) 荧光素酶基因报告试剂盒
- (5) 原位杂交试剂盒

3.1.3 主要设备仪器

- (1) PCR 仪
- (2) 生物安全柜
- (3) 离心机
- (4) 注射器和微量移液器
- (5) 显微操作系统
- (6) 电泳仪
- (7) 酶标仪
- (8) 杂交反应炉

3.2 实验环境

动物饲养及动物实验环境: SPF (Specific Pathogen Free) 动物实验室。

分子生物学实验环境: I 级生物安全实验室。

3.3 实验操作规程

3.3.1 基因编辑小鼠制备

实验采用 CRISPR-Cas9 技术编辑小鼠基因组，使用显微操作系统将混合的向导 RNA 和 Cas9 mRNA（每个 RNA 10 ng / μ l），注射到 FVB/NJ 品系小鼠的合子（每次注射编辑 200 个细胞）。取得 F0 小鼠后，与野生型 FVB/NJ 小鼠杂交以获得后代 F1。

3.3.2 基因编辑小鼠基因型验证

按标识顺序剪取乳鼠脚趾，提取基因组 DNA，通过 PCR 和 Sanger 测序对小鼠进行基因型鉴定，使用荧光素酶报告系统和原位杂交检测 *Tbx6* 表达量及表达位置。

3.3.3 TACS 模型小鼠繁育

将成功鉴定的两种 *Tbx6* 基因编辑小鼠进行配繁，对新生小鼠进行基因型鉴定。

3.4 实验结果

3.4.1 基因编辑小鼠制备

(1) 建立携带罕见突变位点小鼠品系

采用 CRISPR/Cas9 技术在 FVB/NJ 品系小鼠 *Tbx6* 基因第 2 号外显子区域插入一个碱基，造成该等位基因移码突变，形成与 TACS 患者携带罕见突变一致的基因型，基因型为 *Tbx6*^{+/-}，图 1 显示了 *Tbx6*^{+/-} 的基因编辑结果。

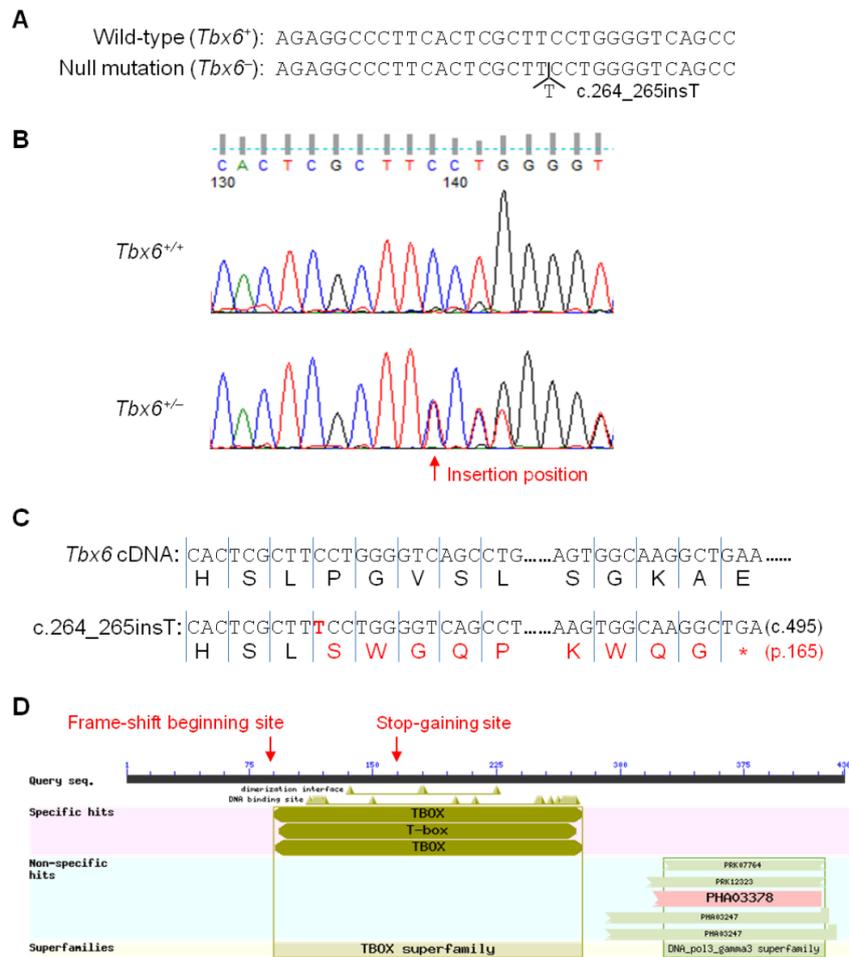


图 1. *Tbx6*^{+/-} 的基因编辑小鼠。(A) 小鼠基因组 chr7:126781858 中 chr7:126781859 插入碱基 T，插入突变(c.264_265insT)位于 *Tbx6* 二号外显子。(B) Sanger 测序显示野生型 *Tbx6*^{+/+} 和杂合敲除 *Tbx6*^{+/-} 碱基序列。(C) 插入碱基后的使 *Tbx6* cDNA 发生移码突变。(D) 突变 *Tbx6* 蛋白功能破坏预测结果。

(2) 建立轻度亚型 (mh) 等位基因小鼠品系

采用 CRISPR-Cas9 技术在小鼠 (FVB/NJ 株) *Tbx6* 启动子中的 T 结合位点敲除部分碱基 (图 2A, 2B)。通过双荧光素酶报告和原位杂交方法筛选鉴定，在 *Tbx6*^{mh} 小鼠中，*Tbx6* 表达水平减少为 *Tbx6* 野生型等位基因的约 65%。

(3) 建立 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸 (TACS) 小鼠模型

通过实验 (1) 和 (2) 中的两种小鼠品系 (F1) 的杂交，对 F2 中的小鼠进行基因型鉴定后，获得符合 TACS 基因型的 F1 代小鼠，基因型为 *Tbx6*^{mh/-}。

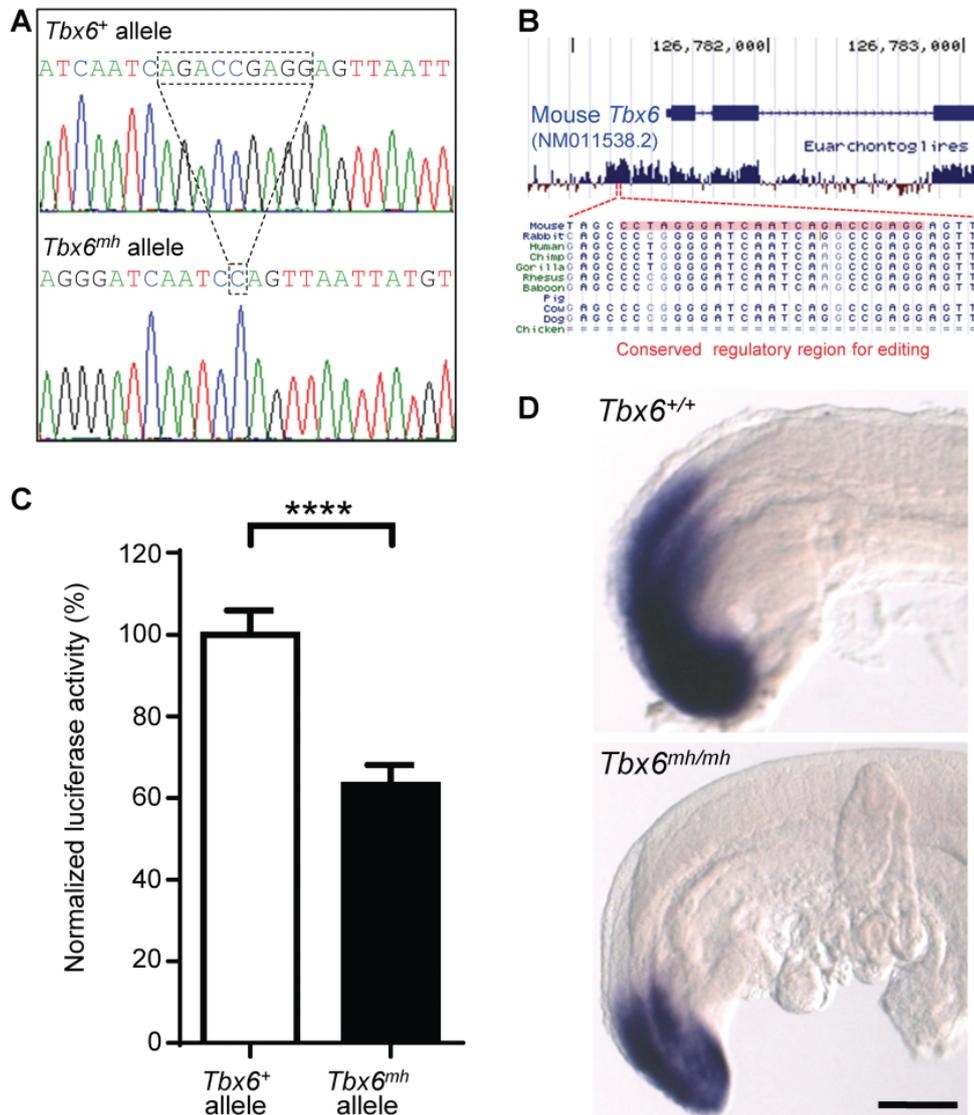


图 2. *Tbx6*^{mh/+} 的基因编辑小鼠。(A) 小鼠基因组 *Tbx6* 基因删除 8 个碱基对 chr7:126781240-126781242 and chr7:126781244-126781248 示意图，插入突变 (c.264_265insT) 位于 *Tbx6* 二号外显子。(B) *Tbx6* 上游调控区保守性分析。(C) 在小鼠来源的 P19CL6 细胞中，使用荧光素酶报告实验研究了 *Tbx6*^{mh} 为亚等效基因。(D) *Tbx6*^{mh} 的亚等效应在 E9.5 小鼠胚胎的全胚胎 RNA 原位杂交体内试验中得到证实。

四、动物模型评价方法

本项目制备的 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸 (TACS) 小鼠模型是通过观察胚胎期和成年期脊柱及肋骨解剖学变化, 比对该突变在 CS 患者脊柱及肋骨形态特征。因此本项目使用阿尔新兰染色和 MicroCT 作为动物模型评价方法。

4.1 阿尔新蓝染色法

4.1.1 试剂

- (1) 阿尔新蓝染液: 0.03 % (w/v), 80 % 无水乙醇, 20 % 冰醋酸
- (2) 甘油
- (3) 1% KOH 溶液
- (4) PBS 缓冲液

4.1.2 设备仪器

- (1) 剪刀及镊子
- (2) 体式显微镜及相机
- (3) 15ml 离心管

4.1.3 方法

- (1) 安乐死孕鼠, 解剖获取 E14.5 胚胎, 放置于 1X PBS 溶液中。
- (2) 去除胚胎外的胎膜组织。
- (3) 将胚胎用 70% 乙醇固定, 4°C 过夜。
- (4) 使用 95% 乙醇替换 70% 乙醇, 室温 1 小时。
- (5) 使用丙酮替换 95% 乙醇, 室温过夜。
- (6) 使用新配置好的阿尔新蓝染液替换丙酮染色 3 小时。
- (7) 使用 1% KOH 溶液替换阿尔新蓝染液, 室温 12 小时。
- (8) 使用 50% 甘油: 50% KOH 溶液 (1%) 溶液替换阿尔新蓝染液, 室温直到胚胎透明化。
- (9) 胚胎透明化后, 将其转移到 100% 甘油中以便长期保存。
- (10) 小心将胚胎转移至透明小皿中, 加入适量 100% 甘油。
- (11) 使用体式显微镜, 采用明场模式进行拍照。

4.2 MicroCT 及样本准备

4.2.1 试剂

(1) 4%多聚甲醛固定液

(2) 设备仪器

(1) high-resolution micro-CT scanner (SkyScan 1176, Bruker)

4.2.2 方法

(1) 安乐死成年小鼠，剔除皮肤及内脏，获取全脊柱和肋骨的组织。

(3) 使用 4%多聚甲醛固定液保存。

(2) 使用高分辨率 CT 扫描对小鼠进行全脊柱扫描。

(3) 参数设置：空间分辨率为 35 μm 像素尺寸，X 射线管电压 50 kVp，X 射线管电流 497 mA，0.5 mm 铝滤光片，2°旋转步进并绕垂直轴旋转 360°。

(4) 图像数据使用使用 GPURecon Serve 重建的。

五、评价指标体系

5.1 评价指标

在人类患者中 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸的表型特征为半椎体、蝴蝶椎、椎体分节不良、肋骨畸形等先天性脊柱侧凸的脊柱畸形，受累节段集中在脊柱下段。以下为本项目构建的模型小鼠的评价体系：

5.1.1 分子生物学水平：小鼠 *Tbx6* 基因及启动子调控突变应同 TACS 患者队列携带致病错义突变联合常见亚效等位基因的复合遗传模式相同。

5.1.2 解剖学水平：小鼠脊柱存在半椎体、蝴蝶椎、椎体分节不良、肋骨畸形等先天性。

5.2 评价结果

5.2.1 分子生物学水平

在 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸人类患者中，*TBX6* 的亚等效基因 *TBX6^{mh}* 的表达剂量约为野生型的 70%。在制备的 *Tbx6^{mh}* 小鼠中，*Tbx6* 表达水平减少为 *Tbx6* 野生型等位基因的约 65%。因此，不仅在基因水平上，本项目制备 *Tbx6^{mh/-}* 小鼠在的错义突变联合常见亚效等位基因的复合遗传模式与人类 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸致病遗传模式相同；并且在基因表达剂量水平上两者也是相近的。

5.2.2 解剖学水平

通过阿尔新蓝染色和 MicroCT 影像学方法,对 *TBX6* 变异小鼠进行表型鉴定,分别发现的 *TBX6*^{mh/-}基因型小鼠 14.5 天胚胎 93%存在明显的先天性脊柱畸形(图 3),成年小鼠 *TBX6*^{mh/-}基因型均存在明显的先天性脊柱畸形(图 4),统计结果相较于其他基因型小鼠有显著差异。该表型结果与携带 *TBX6* 致病错义突变联合常见亚效等位基因的复合遗传模式患者队列的表型统计结果相近(图 5)。

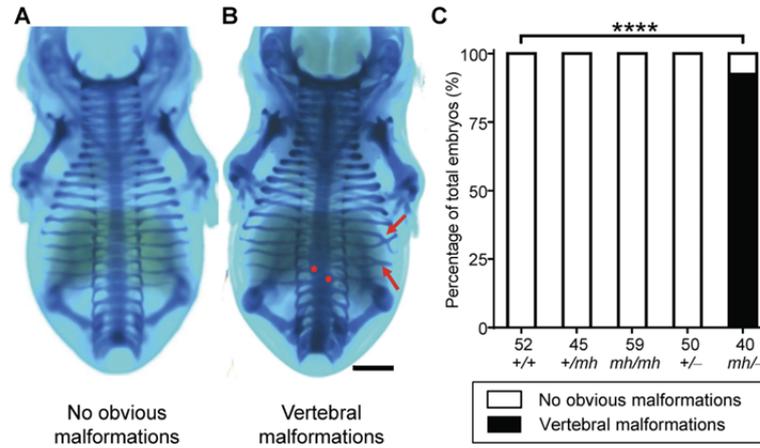


图 3. E14.5 小鼠胚胎阿尔新蓝染色及表型统计结果

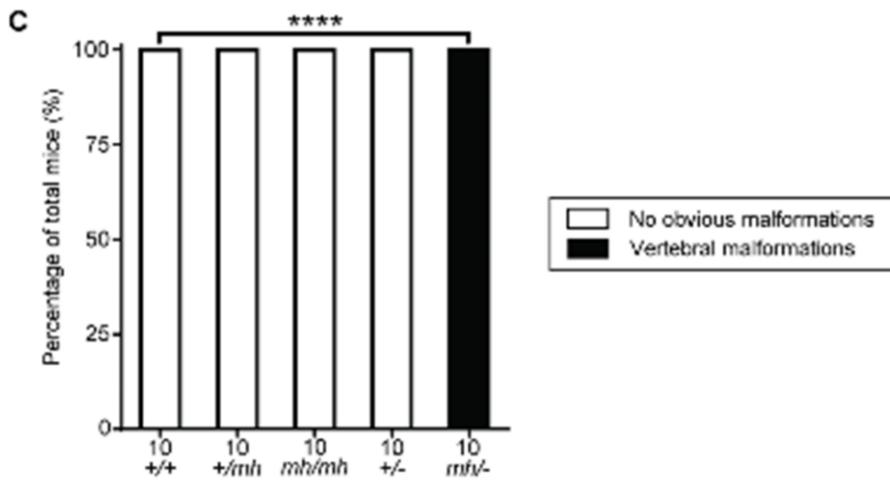
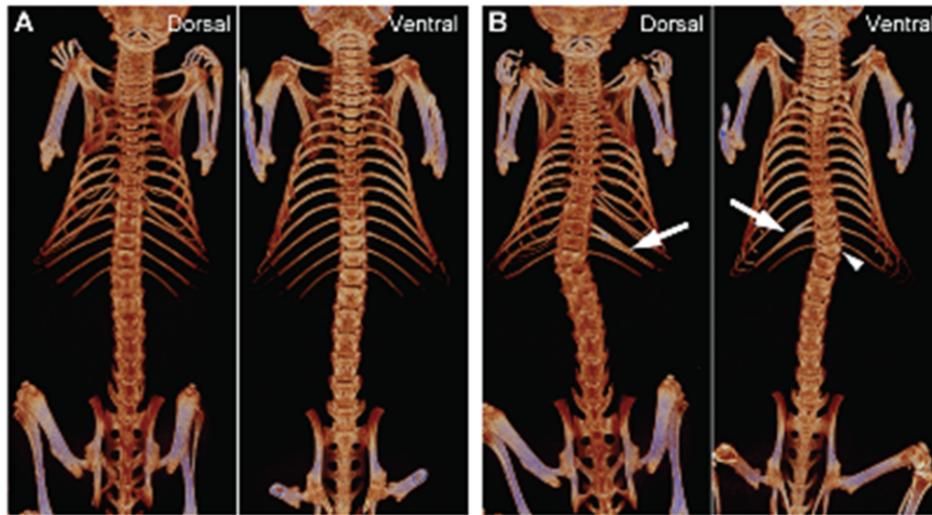


图 4. 成年小鼠 MicroCT 及表型统计结果

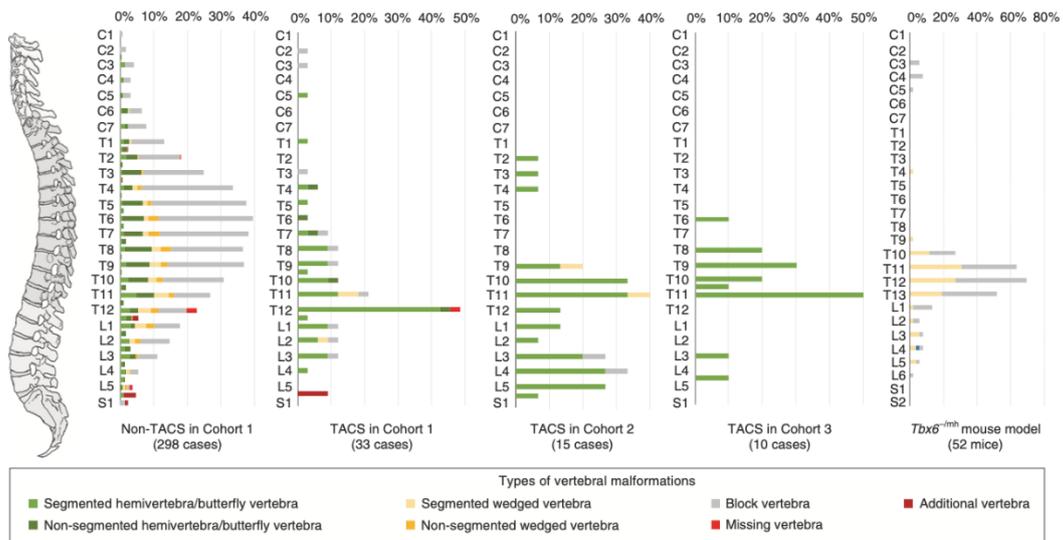


图 5. 对非 TACS 和 TACS 患者以及 *TBX6^{mh}*-小鼠复合遗传和基因剂量模型中异常椎体分布的比较结果图

5.3 重复验证数量

本项目研究重复验证 3 批次。

根据预测和文献观察结果，在小鼠子代的配繁过程中未发现携带 *Tbx6*^{-/-} 纯合子，特定基因型组合的预期比例不同于孟德尔遗传定律，符合 *Tbx6*^{-/-} 胚胎致死的特征。通过遗传交配和表型评估，获取了五种特定基因型的小鼠：*Tbx6*^{+/+} (N=10；野生型)、*Tbx6*^{+/-} (N=10)、*Tbx6*^{+^{mh}} (N=10)、*Tbx6*^{mh/mh} (N=10) 和 *Tbx6*^{mh/-} (N=52)。结果显示，只有 *Tbx6*^{mh/-} 小鼠表现出椎体畸形 (48/52[92.3%]，P=9.3×10⁻⁹[OR,13.0;95%CI,5.1–33.3])。

另一个重要的统计结果发现，所有 *Tbx6*^{mh/mh} 小鼠的椎体畸形分布特征与人类 TACS 患者一样集中在脊柱的下半部分(图 5)。椎柱形成缺陷存在于大多数 *Tbx6*^{mh/mh} 小鼠中 (36/52[69.2%]，P=4.9×10⁻⁵[OR,3.3;95%CI,2.2–4.9])。

5.4 阳性药物证实

本项目所构建的 *TBX6* 相关先天性脊柱侧凸为首次报道，既往的研究报道中尚未有成功使用阳性药物和基因编辑动物模型(缺失突变联合常见亚效等位基因的复合遗传)构建该动物模型，因此本项目无阳性药物和相同指标结果进行证实效应的参考。

六、动物模型的安全性评价

6.1. 监督管理

在整个制备过程中，研究遵循实验动物委员会 (IACUC) 的审批合格的动物伦理要求，确保动物的福祉和动物实验的伦理性。同时，本项目严格遵照生物安全实验室标准操作规程以及实验相关设备设施的管理要求。

6.2. 处置措施

在整个制备过程中，定期更新或处置不再需要的动物或生物材料，避免不必要的饲养和维护成本，同时确保动物的生命质量。对于需要进行安乐死处理的动物实施合规的处置程序，根据 IACUC 批准的处置方案，采取二氧化碳安乐死，尸体等废弃物委托专业处理机构进行无害化消杀处理。

6.3. 遗传分析

在基因编辑动物模型的制备过程中，研究使用分子生物学技术，如 PCR、

Sanger 测序等方法，进行基因型分析，并验证基因编辑的目标基因是否按预期发生变化，确保动物模型的遗传信息准确无误。

6.4. 对环境和生态影响

本动物模型制备过程，主要依托所在单位动物实验中心及实验室，遵循所在单位机构及环评部门相关法规和标准。对包括废弃物处理、动物饲养条件、尸体无害化处理等过程严格控制，以最大化减少对周边环境的负面影响。

七、讨论和结论

先天性脊柱侧凸是由于人类胚胎期脊柱发育异常而导致的三维畸形，影响婴幼儿及青少年的生长发育，使身体变形，严重者可以影响心肺发育和功能、甚至累及脊髓，造成瘫痪。部分患者在胎儿和婴幼儿阶段进展迅速，容易错过最佳治疗时机，给家庭和社会造成了严重负担。因为先天性脊柱侧凸发病窗口主要集中在胚胎发育期和婴幼儿时期，所以该疾病在人体研究和临床研究上存在巨大的伦理挑战和技术挑战。因此，建立先天性脊柱侧凸的疾病模型是突破该疾病的研究壁垒的必经之路。相较于其他动物模型，小鼠在先天性脊柱侧凸研究中被认为是理想的模型。小鼠作为哺乳动物，其生理结构和遗传机制与人类相似，使得它成为研究先天性脊柱侧凸发病机制和治疗方法的理想选择。小鼠的快速繁殖周期、相对低的维护成本以及丰富的遗传工具和技术使得研究者能够更深入地探究该疾病的发展和进展。此外，小鼠模型能够提供对脊柱生长和发育的观察窗，以及在不同发育阶段对先天性脊柱侧凸的响应。

本模型主要通过采用CRISPR/Cas9技术在FVB/NJ品系小鼠*Tbx6*基因第2号外显子区域插入一个碱基，造成该等位基因移码突变，形成与TACS患者携带罕见突变一致的基因型，基因型为*Tbx6*^{+/-}。进一步采用CRISPR/Cas9敲除*Tbx6*启动子区域部分碱基，形成启动子敲减模型，基因型为*Tbx6*^{mh/+}。通过两种小鼠品系(F1)的杂交，形成符合TACS基因型的F2代小鼠，基因型为*Tbx6*^{mh/-}。对于基因水平上的鉴定我们采用Sanger测序进行确认；对于先天性脊柱畸形的疾病表型鉴定我们采用骨骼染色和MicroCT方法统计分析畸形比例和畸形部位分布，发现小鼠的椎体畸形全部集中于脊柱下段，与临床*TBX6*相关先天性脊柱侧凸(*TBX6*-Associated Congenital Scoliosis, TACS)患者队列的中观察到的表型和致病模式具有一致性。

对既往 *Tbx6* 基因突变模型小鼠相关研究进行回顾性分析。1985 年, Theiler K 等人发现隐性突变 Rib-vertebrae(rv)纯和小鼠由于体节排列紊乱导致下肋骨的融合和椎体的畸形[1]。1998 年, Chapman DL 等人靶向敲除 *Tbx6* 的 1 号、2 号和 3 号部分外显子, 发现 *Tbx6* 突变影响体侧中胚层分化、形成不规则的体节, 而更后方的体侧组织不形成体节[2, 3]。2002 年, Watabe-Rudolph M 等人发现 Rib-vertebrae(rv)自发突变小鼠中, rv 基因突变发生在 *Tbx6* 启动子, 胚胎原位杂交表明该突变导致 *Tbx6* 转录水平下调, 表明 *Tbx6^{rv}* 是 *Tbx6* 亚等效基因。rv 纯和突变小鼠存在脊柱肋骨形态发育异常; 同时, *Tbx6^{rv/-}* 小鼠出生后无法成活, 其脊柱肋骨畸形严重程度明显大于 *Tbx6^{rv/rv}*[4]。虽然 *Tbx6^{rv/-}* 小鼠在疾病表型上与本项目申请的 *Tbx6^{mh/-}* 小鼠相似, 但相比于 *Tbx6^{rv/-}* 模型, *Tbx6^{mh/-}* 模型中 *Tbx6* 的转录水平更接近 TACS 患者; 另一方面, *Tbx6^{mh/-}* 模型在椎体畸形的形态、数量、肋骨畸形形态以及畸形分布方面也与 TACS 患者更为相似。非常重要的一点是, *Tbx6^{mh/-}* 模型可以正常发育至成年, 为在出生后阶段对该疾病病因、进展相关研究以及临床干预等方面提供了可能性, 这是既往相似模型所不具备的优势。2017 年, Yasuhiko Y 等人通过基因编辑技术在 *Tbx6* 的 3 号到 5 号外显子两侧插入 loxP 结构, 构建了 *Tbx6*-flox 小鼠, 用于研究 *Tbx6* 转录调控的结合位点[5]。尽管该模型可以根据 Cre/loxP 系统选择对应的 Cre 进行组织特异性研究, 但该动物模型尚未有进一步对脊柱发育表型研究的报道。

N	Strain Name	Synonyms	States	Repository	Mutation Types	Alleles	Genes	Strain Types
?	ICR.Cg-Tg(FALG-Tbx6)/Rbrc		embryo sperm	RBRC	transgenic transgenic	Tbx6 T-box 6 Tg(FALG-Tbx6) transgene insertion	Tbx6 T-box 6 Tg(FALG-Tbx6) transgene insertion	mutant strain
+	B6.L-Tbx6 ^Y /J	B6.L-rv/+	embryo	JAX	spontaneous mutation	Tbx6 ^Y rib-vertebrae	Tbx6 T-box 6	mutant strain congenic strain
+	ICR.Cg-Tbx6 ^{tm1} /Rbrc		sperm	RBRC	targeted mutation	Tbx6 ^{tm1} targeted mutation 1	Tbx6 T-box 6	mutant stock
+	STOCK Tbx6 ^{tm2Pa} /Mmjax		archived sperm	MMRRC	targeted mutation targeted mutation	Tbx6 ^{tm2Pa} targeted mutation 2, Virginia Papaioannou	Tbx6 ^{tm2Pa} T-box 6; targeted mutation 2, Virginia Papaioannou Tbx6 T-box 6	unclassified
-	B6J.129-Tbx6 ^{tm1Pa} /Mmjax		archived sperm	MMRRC	targeted mutation	Tbx6 ^{tm1Pa} targeted mutation 1, Virginia Papaioannou	Tbx6 T-box 6 Tbx6 ^{tm1Pa} T-box 6; targeted mutation 1, Virginia Papaioannou	unclassified

图 6 findmice 数据库中记录 *Tbx6* 基因编辑小鼠 ([IMSR Summary \(findmice.org\)](https://www.findmice.org/))

总之, 我们的 *Tbx6^{mh/-}* 模型小鼠是基于真实人类患者中明确的遗传改变信息, 使用脱靶效应更低, 基因编辑准确性更高, 重复性更好的 CRISPR/Cas9 技术, 构建了与临床患者基因表达水平和临床表型最为接近的疾病模型动物。我们所申报的模型有更加完整的疾病发生发展过程, 可精准复现生理病理学变化, 提

供包括基因治疗、细胞治疗、药物干预和手术方案的临床应用潜力。共享该疾病模型可以为其他研究者提全周期的动物疾病研究模型，有助于帮助更多的研究者和研究资源有效投入，以更全面、更精准地理解疾病的本质和寻找创新的治疗途径，最终帮助到先天性脊柱侧弯患者，促进人民生命健康，减少社会经济效益损失。

参考文献

1. Theiler K, Varnum DS. Development of rib-vertebrae: a new mutation in the house mouse with accessory caudal duplications. *Anat Embryol (Berl)*. 1985;173(1):111-6. doi: 10.1007/BF00707309. PMID: 4073528.
2. Chapman DL, Agulnik I, Hancock S, Silver LM, Papaioannou VE. Tbx6, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev Biol*. 1996 Dec 15;180(2):534-42. doi: 10.1006/dbio.1996.0326. PMID: 8954725.
3. Chapman DL, Papaioannou VE. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6. *Nature*. 1998 Feb 12;391(6668):695-7. doi: 10.1038/35624. PMID: 9490412.
4. Watabe-Rudolph M, Schlautmann N, Papaioannou VE, Gossler A. The mouse rib-vertebrae mutation is a hypomorphic Tbx6 allele. *Mech Dev*. 2002 Dec;119(2):251-6. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00394-5. PMID: 12464437.
5. Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Ono R. LTRs of Endogenous Retroviruses as a Source of Tbx6 Binding Sites. *Front Chem*. 2017 Jun 15;5:34. doi:10.3389/fchem.2017.00034. PMID: 28664156; PMCID: PMC5471307.

八、有助于动物模型鉴定和评价的其它材料

申请团队发表与本项目所申报动物模型主要相关的论文如下：

1. 人群队列中 **TBX6 缺失突变联合常见突变解释约 10%先天性脊柱侧凸遗传机制**。该研究揭示了 *TBX6* 是迄今最重要的先天性脊柱侧凸致病基因，解释了 *TBX6* 基因致病的复合遗传机理。该成果在医学类 Top 期刊《新英格兰杂志》报道，引用次数 **185** 次。Wu N, Ming X, Xiao J, et al. TBX6 null variants and a common hypomorphic allele in congenital scoliosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2015, 372(4): 341-350.

2. 通过 CRISPR/Cas9 技术建立符合 *TBX6* 基因复合致病模式的小鼠模型（TACS 小鼠模型），经品系鉴定、表型验证和统计分析，该小鼠模型与 *TBX6* 患者队列表型一致。支持了人类 CVM 中 *TBX6* 复合杂合的遗传模型。该研究成果 Q1 区《人类分子遗传学》杂志报道，引用次数 **46** 次。Yang N, Wu N, Zhang L, et al. *TBX6* compound inheritance leads to congenital vertebral malformations in humans and mice[J]. *Human molecular genetics*, 2019, 28(4): 539-547.
3. 通过中国、日本和美国多个中心、多个人种队列以及小鼠模型的整合分析，在国际上创新性地提出了先天性脊柱侧凸的首个分子遗传分型，将先天性脊柱侧凸分为 *TBX6* 基因相关性先天性脊柱侧凸（*TBX6*-associated congenital scoliosis, TACS）和非 *TBX6* 基因相关性先天性脊柱侧凸（Non-TACS），通过临床表型分析证实 TACS 患者临床症状出现更早，以下半段脊柱的半椎体和蝴蝶椎为典型特征，且表现为更少的脊柱、肋骨和椎管内畸形受累。建立的 *TBX6* 复合突变的小鼠模型，验证了 *TBX6* 基因剂量模型和 TACS 临床表型的生物学基础。该研究成果在遗传学 Top 期刊《医学遗传学》报道，引用次数 **56**。Liu J, Wu N, Deciphering Disorders Involving Scoliosis and COmorbidities (DISCO) study, et al. *TBX6*-associated congenital scoliosis (TACS) as a clinically distinguishable subtype of congenital scoliosis: further evidence supporting the compound inheritance and *TBX6* gene dosage model[J]. *Genetics in Medicine*, 2019, 21(7): 1548-1558.