



基因修饰工具猪模型的建立及应用

李小平,王可品,刘琪帅,赖良学*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院再生生物学重点实验室,广州 510530)

【摘要】 基因修饰工具动物模型是指对已知基因加以修饰建立的,能够作为工具,从而帮助实现其他目的基因修饰动物模型。工具动物模型在生物学研究和生物医药开发中具有非常重要的作用,尤其是基因修饰动物模型在基因功能和信号通路等生物学基础研究方面做出了突出贡献。猪不仅是重要的农业经济动物,由于猪在器官结构、大小以及生理代谢方面与人更加接近,因此,猪也是比较理想的生物医药大动物模型。近几年,由于基因编辑技术的突破,工具猪模型的建立取得了引人注目的进展,人们已先后培育出了细胞多能性示踪工具猪模型,如细胞谱系示踪工具猪模型,可用于重组酶介导的基因交换工具猪模型,免疫缺陷猪模型以及可用于体内基因编辑的基因修饰工具猪模型,这些工具猪已逐渐得到推广应用。本文重点拟对具有广泛用途的基因修饰工具猪模型的研究进展和应用进行综述。

【关键词】 猪;基因修饰;工具

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017)03-0329-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.018

Establishment and application of genetically modified pig tool models

LI Xiao-ping, WANG Ke-pin, LIU Qi-shuai, LAI Liang-xue*

(Key Laboratory of Regenerative Biology of The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

【Abstract】 Genetically modified tool animal models are the animal models, which are generated by modifying a defined gene and can be used as a tool to help realize other objective. Genetically modified large animals have wide applications in agriculture and biomedicine. Tool animal models play important role in biological research and development of new drugs in biomedicine, especially, have made tremendous contribution in revealing gene function and pathway of signal transduction. Pigs are not only an economically important agriculture animals, but also an ideal animal model in biomedicine due to its close similarity to human in physiology, as well as organ structure and size. Thanks to the breakthrough of newly emerged gene editing technology, striking progress has made in establishment of genetically modified tool pig models which include the ones used for monitoring pluripotency of cells, tracing cell lineages, replacing genes mediated by Cre recombinase, mimicking immunodeficiency, as well as gene editing in vivo. These tool models have been widely applied in biological research. Here, we will review the progress in generation of genetically modified tool pig models and their applications.

【Key words】 Pigs; Gene modification; Tool pig models

Corresponding author: LAI Liang-xue. Email: lai_liangxue@gibh.ac.cn

基因修饰动物是指通过人工突变的途径获得的动物品系。它既可以通过转入外源基因,也可以通

过突变动物本身的基因来实现。工具动物模型是指对已知基因加以修饰建立的,能够作为工具,从而帮

[基金项目] 国家自然科学基金(编号:81672317,81671121)。

[作者简介] 李小平(1986-),男,副研究员,博士,研究方向:基因修饰动物与干细胞。Email: li_xiaoping@gibh.ac.cn

[通讯作者] 赖良学(1963-),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:基因修饰动物与干细胞。Email: lai_liangxue@gibh.ac.cn

助实现其他目的基因修饰的动物模型。在小鼠,基因修饰工具模型已被大量的建立和使用,如干细胞标记鼠模型(OG2 转基因小鼠^[11])、Cre/loxP 基因修饰小鼠^[2]、免疫缺陷小鼠^[3]等,这些工具鼠模型极大地推动了生命科学和生物医药研究进展。

猪不仅在农业上是主要的经济动物之一,而且在生物医药领域猪也有广泛的用途。首先,猪是良好的人类疾病动物模型,猪的心血管系统、消化系统、皮肤、营养需要、骨骼发育以及矿物质代谢等都与人的情况极其相似,猪的体型大小和驯服习性允许进行反复采样,且繁殖周期短、生产力高,一窝仔多。基因修饰实验动物模型对于研究人类疾病相关基因功能,疾病表型与基因型的联系,以及疾病的诊断、治疗都具有重要作用,也可以作为重要的药物评价模型^[4]。再次,猪是比较理想的异种器官移植供体,利用转基因技术改造异种来源器官的遗传性状,使之能适用于人体器官或组织的移植,是解决器官移植短缺的最有效途径。

通过基因修饰的途径,如同小鼠一样,建立针对不同应用目的的工具猪将推动猪在以上应用价值的快速实现。基因工程工具动物的建立往往涉及到多基因转移、多步骤基因定点打靶的技术运用才能实现。然而,迄今为止猪胚胎干细胞尚未成功建系,利用诱导多能干细胞技术制备的猪诱导多能干细胞并不具有生殖系嵌合能力,基因修饰猪的制备主要依赖于体细胞基因修饰和体细胞核移植技术相结合来完成的。体细胞的增殖能力有限,对其进行基因修饰,尤其是基因打靶效率极低,基因修饰工具猪模型的建立也就十分困难。近年来,人工核酸内切酶 ZFN^[5,6]、TALEN^[7,8] 和 RNA 介导的 Cas9 核酸酶^[9,10] 的开发为基因敲除技术带来了革命性的突破,解决了猪基因靶向修饰难的问题,使基因修饰工具猪模型的建立变成了可能,得益于此,基因工程工具猪的建立呈现出快速发展的趋势。

1 细胞多能性示踪工具猪模型

建立如同小鼠一样的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)^[11],一直是干细胞领域几十年追求的梦想,但到现在,还没有得到真正的具有生殖系嵌合能力的猪胚胎干细胞。近几年,受到小鼠诱导多能干细胞技术启发,很多干细胞生物学家尝试建立猪多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iP-SCs),如 Ezashi 等^[12]和 Wu 等^[13,14]报道利用慢病毒

或 doxycycline 诱导的慢病毒对家猪骨髓间充质干细胞、耳朵成纤维细胞以及胎儿成纤维细胞进行诱导,获得了体内分化实验可形成包含三个胚层的畸胎瘤,能形成类胚体,但均未见生殖系嵌合的后续报道^[12-14]。对猪的早期猪胚胎发育机制尚不完全清楚,是猪多能性细胞建立不能成功主要原因之一。从前的一些研究结果表明,猪的胚胎发育有其特殊之处与小鼠和人相比均有较大差异。如:猪的胚胎在着床前,大约受精后 12 d 左右发育成长达一米左右的带状胚;猪胚胎上胚层 epiblast 的形成比其他物种较晚,且需持续 4 d 才能完全分化^[15]。猪的细胞多能性的维持和自我更新的机制上有很多未知之处,建立能够追踪细胞多能性状态的工具猪模型将有助于对其加以更深入的研究。Oct4 转录因子对多能性干细胞的维持和自我更新起着至关重要的作用,是多能性细胞的一个重要标记。1999 年, Yoshimizu 等^[16]构建了将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因插入在 *Oct4* 基因下游构建了一个长约 18 k 的 BAC 载体,通过显微注射鼠受精卵原核获得了荧光示踪 *Oct4* 基因的表达的 OG2 小鼠模型。该模型被广泛应用于生殖细胞体内迁移、分化机制研究,极大地推动了小鼠多能干细胞的研究。实际上,第一批小鼠 IPS 细胞的建立是基于能够追踪小鼠细胞多潜能性的基因工具鼠上建立的^[17]。

基于相同的目的,很多实验室在建立能够追踪猪细胞多潜能性的基因工具猪进行了尝试,并取得了重要进展。最初几篇报道均采用转基因技术来培育这种工具猪。2009 年,日本科学家 Miyoshi 等^[18]构建了含鼠源 *Oct4* 启动子的 pMOct4-eGFP 载体,利用筛选获得的阳性 pMOct4-eGFP 转基因体细胞作为体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SC-NT)供体,获得了体外培养表达绿色荧光的囊胚。2010 年德国的一个课题组采取相同策略,获得生殖系特异表达并可进行生殖系传递的绿色荧光转基因猪^[19]。虽然小鼠、猪和人 *Oct4* 核型启动子具有较高序列保守性,但在某些功能性序列上仍具有较大差异,如 CR2/CR3 区,以及 EIV/EV 区,因此有可能造成异源 *Oct4* 启动子不能真实反映猪内源 *Oct4* 基因的表达特异性和表达水平。基于这种担忧,2011 年,本实验室采用猪内源 *Oct4* 基因的启动子来建立 Oct4-eGFP 工具猪,含有 3.2 kb 猪源 *Oct4* 启动子的 Oct4-eGFP 载体成纤维细胞,经体细胞核移植,

所获得克隆囊胚能够表达绿色荧光的;同时经逆转录病毒转染,可将阳性细胞重编程至表达绿色荧光的 iPSC 细胞^[20]。我们的系统选用猪源 *Oct4* 启动子,解决了物种间序列差异问题,能较为真实的反映内源 *Oct4* 的表达情况。但该系统所构建的报告载体中,仅构建了 *Oct4* 起始密码子上游约 3.2 bp 序列作为其启动子序列,这可能缺乏完整的 *Oct4* 调控元件。得益于 CRISPR/Cas9 高效的基因靶向修饰效率,本实验室进一步通过同源重组基因修饰技术,将红色荧光蛋白基因 2A-tdTomato 序列插入并替换猪 *Oct4* 基因的终止密码子。该系统中,猪完整的天然内源性 *Oct4* 启动子直接控制红色荧光蛋白的表达,因此荧光能准确地显示内源性 *Oct4* 的表达特异性及表达水平。将基因靶向修饰的体细胞作为核供体,进行核移植,当重构胚胎发育到囊胚后,能够表达较强的红色荧光。将克隆胚胎移植到代孕母猪后,妊娠至 35 d,在胎儿生殖脊中,可观察到红色荧光的表达,而在其他组织中未见其表达。来自克隆胎儿和仔猪的成纤维细胞不表达红色荧光,但将它们作为核供体,进行第二轮 SCNT,重构胚胎发育到囊胚后红色荧光再次表达^[21]。这种模型基因敲入工具猪模型,在多能性细胞中,荧光表达更灵敏、更强和更稳定,比转基因模型更好地反映该猪细胞多能性状态,因此,是目前用于追踪猪细胞多能性状态最理想的工具猪模型。我们相信,这一模型的建立将极大地推动猪多能性细胞系建立的研究进展。

2 细胞谱系示踪工具猪模型

多细胞生物生长发育的本质其实是细胞的分裂和分化,在哺乳动物的胚胎发育早期,单个细胞及其所有后代细胞的分化和发育活动逐渐被确定,即细胞命运决定。要弄清分化发育的过程,需要对细胞的谱系进行追踪,因此,建立能在特定细胞加入示踪标记的基因修饰工具动物模型将对深入开展胚胎发育和细胞分化的过程和机制研究提供极大地帮助。

P1 噬菌体的 Cre-loxP 位点特异性重组系统可对特异的基因表达进行调控;广泛表达于各种组织的 *Rosa26* 基因,可启动植入其启动子的下游的外源基因,保证其稳定和高效表达,将报告基因或毒性基因植入其下游就可用于追踪和删除特定的细胞谱系。将 Cre-loxP 和 *Rosa26* 这两种基因加以结合,建立修饰工具动物模型,理论上就可对带有特有表达基因的任何组织和细胞加以追踪。在小鼠,将特定

启动子驱动的 Cre 转基因小鼠和 *Rosa26* 位点带有 loxP 报告基因的转基因小鼠结合,Cre 切除 loxP 位点之间的转录终止序列从而激活 *Rosa26* 启动子下游报告基因的持续表达,已成为研究器官发育、组织损伤修复以及单细胞的分化命运的一种重要手段。由于该修饰是在 DNA 水平上进行的,可遗传到子代细胞,因此可永久标记某类细胞,并用于研究其子代细胞的命运。

猪的某些器官(如心脏)的结构和发育过程与人比较接近人类,是研究人类相应器官、组织发育的理想模型,因此,建立能够示踪猪细胞谱系的基因修饰工具猪模型,将对研究人类的器官的发生、发育过程有重要的参考作用。Li 等^[22]于 2009 年首次建立了能够检测 Cre 活性的 EGFP 转基因猪报告模型。2010 年 Chen 等^[23]制备了干扰素诱导性表达 Cre 重组酶转基因猪模型 Mx1 - Cre。他们利用高效干扰素诱导剂聚肌胞进行诱导,在猪各个组织中都检测表达 Cre 重组酶的表达。此外,2014 年 Luo 等^[24]利用猪肾脏特异性表达基因水通道蛋白 *AQP2* (aquaporin 2) 启动子,制备了肾脏特异性表达 Cre 重组酶的转基因小型猪。但由于采用传统的随机转基因技术,报告基因在猪基因组中的整合位点和拷贝数不可控、被 Cre 重组酶激活后报告基因在猪体内的表达不理想。为了解决这个问题,2014 年,我们对猪的 *Rosa26* 位点加以利用,首先在猪的 13 号染色体鉴定出猪 *Rosa26* 位点,在此基础上,采用 TALEN 介导的基因打靶技术将 loxP 和 GFP 基因向插入到 *Rosa26* 基因位点,然后利用体细胞核移植技术成功获得了 *Rosa26* 基因驱动的条件性表达报告基因的基因打靶工具猪模型^[25]。该动物模型已成为猪发育过程中谱系示踪重要工具。利用这一工具猪,我们建立了在心脏祖细胞标记基因 *ISL1* 基因内源启动下游,敲入 Cre 重组酶基因子的基因打靶猪,对 *ISL1* + 心脏祖细胞谱系在胚胎中和成体内成功地进行了标记(未发表)。

3 可用于重组酶介导的基因交换工具猪模型

体细胞的基因修饰主要有宿主基因定点打靶和外源基因随机插入两种方法。人工核酸内切酶 ZFN、TALEN 和 RNA 介导的 Cas9 核酸酶的出现解决了基因定点打靶效率低下的问题。然而通过高表达外源基因制备具有特定性状的基因修饰动物,在疾病模型及新品种培育中具有不可替代的作用。目

前采用的随机转基因方法存在外源基因在基因组中的整合位点和拷贝数不可控、外源基因在猪体内表达不稳定、转基因猪个体之间表型差异等问题,严重制约了基因修饰猪的培育与应用。基因定点打靶虽可解决随机整合带来的问题,但一般都是将外源基因整合在内源启动子的下游,而很多内源基因的表达本身就不高,因此,不能实现外源基因的过表达。

哺乳动物的存在着这样一些基因,他们在各种组织高表达,如果在其启动子的下游转入一个外基因,该外源基因就能在被转入的动物体内高效表达,目前发现的基因位点有 *Rosa26* 位点、*H11* 位点、*H2-Tw3*、*Hprt* 等,这些位点拥有整合效率高,表达稳定,插入基因表达量高等优势,在小鼠的转基因培育中得到证实与并广泛运用。其中以 *Rosa26* 位点及 *H11* 位点使用最为广泛,由于每一个基因都定点转入同一个位点,如果在其启动子下游注入 *loxP* 序列,再加上一个报告基因,人们就不需要每次都运用人核酸酶系统来实现基因打靶,只需注入 Cre 重组酶基因和带有目的基因的同源臂,就可实现基因交换,达到外源基因的在该位点的定点目的。并且,由于有报告基因的存在,对于基因打靶的阳性克隆的筛选也变得直接而又简单,同时由于重组酶介导的基因交换无需药物筛选即可获得,从而使获得的转基因猪不携带外源的药物抗性基因,对培育农业转基因猪而言,可减低转基因猪农产品的生物安全和食品安全隐患。

本实验室于 2014 年首次鉴定出猪 *Rosa26* 位点,采用 TALEN 介导的基因打靶技术对猪 *Rosa26* 基因位点进行了高效的靶向修饰,基因打靶效率可达到 48%,继而利用体细胞核移植技术成功获得了 *Rosa26* 基因打靶猪模型。在上述基础上,我们在 p*ROSA26* 位点引入一对异源 *loxP* 位点,利用 Cre 重组酶介导的基因交换,成功地将绿色荧光蛋白 EGFP 基因替换为红色荧光蛋白 tdTomato 基因,红色荧光蛋白在猪的各种器官均高效表达,构建了第一个重组酶介导的基因交换猪模型。利用该模型,我们可以将任意基因通过重组酶介导的基因交换插入到 *Rosa26* 位点,实现目的基因在大动物所有组织中的无差异表达^[25]。国内外其他实验室也开展了相似的研究工作,德国实验室的 Li 等^[26]在猪 *Rosa26* 位点定点插入了一个 Cre 重组酶双荧光报告基因;东北农业大学 Kong 等^[27]在 *Rosa26* 位点插入了肌肉特异性表达基因 *myostatin* 启动子,实现了目的基因

在肌肉组织特异性表达。2015 年 Ruan 等^[28]在猪基因组 14 号染色体鉴定出猪 *H11* 位点,利用 CRISPR/Cas9 介导的基因靶向修饰技术,他们成功对猪 *H11* 位点进行了靶向修饰。

4 免疫缺陷猪模型

免疫缺陷动物模型指由于先天性遗传突变或人工方法造成一种或多种免疫系统成分缺陷的动物,在免疫、感染、肿瘤和再生医学等研究中有很高的应用价值,目前应用最广泛的是免疫缺陷小鼠。但是,小鼠的免疫源性与人类遗传差距较大,往往不能很好地反应人类的生理状态和体内微环境。就免疫系统而言,小鼠与人类几乎在免疫功能与调节方式的各个方面都有很大差别^[29],在炎症应答中,小鼠模型基本不能模拟人类疾病的基因表达且个体间差异大^[30]。另外,小鼠体型小,寿命短,这使在小鼠上实施外科手术等临床操作十分困难,在使用药物和移植细胞或者组织后也不能进行长期的观察和预后跟踪。所以,在临床前研究中,免疫缺陷小鼠中进行的药物筛选和免疫评估及开发的临床操作在人体内不一定得到相同效果。

对猪免疫系统的发育和免疫应答的发生机制的研究发现,其免疫系统与人类相似^[31-32],免疫相关基因与人类同源比例很高^[33],被认为是研究人类免疫与疾病的良好模型。所以,免疫缺陷猪能克服现有其他免疫缺陷小鼠的局限,为免疫、肿瘤和再生医学等相关研究,尤其是临床前研究,提供更为理想的工具。早在 2011 年, Mendicino 等^[34]就利用传统同源重组基因打靶技术将猪免疫球蛋白重链 (IgH) J 片段基因敲除,所获得的基因敲除猪体内没有成熟的 B 细胞,也无法产生抗体。2012 年,又制备了白介素 2 受体 γ 亚基基因 (*Il2rg*) 敲除猪^[35]。白介素 2 受体可与白介素 4/7/9 等以高亲和力结合,激活下游信号通路,影响 T 细胞和 NK 细胞的发育。Suzuki 等报道的 *Il2rg* 敲除猪没有胸腺,几乎没有 NK 细胞和 T 细胞减少, B 细胞无正常功能,比小鼠能更好地模拟人类 X-SCID。随后, Watanabe 等^[36]报道了类似的结果。2014 年包括本实验室在内的两个实验室利用 TALEN 介导的基因靶向修饰技术相继获得了重组激活基因 (recombination activating gene, RAG) 敲除猪^[37,38]。RAG 包括 *RAG1* 和 *RAG2*,两者排列于同一染色体上邻近的位置。*RAG1* 和 *RAG2* 共同表达于 T、B 细胞的前体细胞中,分别编码

RAG1 和 RAG2 蛋白,在 T、B 细胞的发育中起到至关重要的作用^[39]。本实验室获得了 RAG 基因敲除猪后,我们对 RAG1 或 RAG2 (*RAG1^{or}RAG2*, *RAG1/2*) 纯合敲除猪分别进行了分析,与对照的野生型猪相比, RAG 基因敲除猪的胸腺严重发育不全,变得极小或消失;脾脏变薄,组织切片观察,没有明显的淋巴细胞聚集区;外周血、胸腺、骨髓和脾脏中未发现成熟的 T 细胞和 B 细胞, V(D)J 重组也消失。RAG 基因敲除猪呈现明显的重症联合免疫缺陷表型,而且 RAG1 和 RAG2 的纯合敲除猪表型一致,均可作为免疫缺陷猪模型。杂合子在普通的饲养环境中,生长发育正常,并能够繁殖后代;但纯合敲除猪生长明显缓慢,由于免疫能力降低,对微生物感染没有抵抗能力,在出生不久后陆续死亡,最长存活 30 多天,即在断奶后死亡。如果在无病原微生物的洁净环境中饲养,如同免疫缺陷鼠一样,纯合子免疫缺陷猪应该能长期存活^[38]。免疫缺陷猪可成为生产人类组织器官的工具。在临床上,活体捐肝切下的供体肝体积较小,往往在接受肝脏器官的病人中引起小肝综合症。在小鼠中的研究表明,如果将人的肝组织移植入免疫缺陷性小鼠中,人的肝脏能够增殖,体积变大。利用免疫缺陷猪,可以进行相同尝试,解决肝脏移植手术中出现的小肝综合征问题。另外,如果将免疫缺陷猪和肝脏缺陷猪相结合,将人的肝细胞移植到这种双器官缺陷猪体内,有望从猪体内获得可用于药物测试的人肝细胞。

5 可用于体内基因编辑的基因修饰工具猪模型

CRISPR/Cas9 是最新出现的一种由 RNA 指导的 Cas9 核酸酶对靶向基因进行编辑的技术,基因靶向修饰的特异性由 gRNA 决定,可以通过设计多条 gRNA,实现多个基因的同时修饰^[9,10]。根据 CRISPR/Cas9 的这些特点,研究人员把 CRISPR/Cas9 系统应用在成体小鼠体内进行条件性敲除。多个研究团队通过注射 CRISPR/Cas9 病毒或质粒获得各种癌症模型,包括肝癌^[40]、肺癌^[41-43]、胰腺癌^[44,45]和结直肠癌^[46]等多种实体肿瘤模型。这种方法避开了在细胞或胚胎水平上的编辑,以及小鼠饲养和交配的繁琐等问题,同时为癌症模型的构建和基因组学的研究提供了新方法和新思路。但是, Cas9 基因长度长达 4.3 kb 左右,直接转入成体组织效率极低,给成体动物体内基因编辑带来较高的不确定性。张锋及其研究团队又创造性设计了一条新

的思路,即将上游带有 *loxP* 位点 Cas9 基因敲入小鼠体内,构建出一个细胞内能够条件性表达 Cas9 的小鼠 (*iCas9* 小鼠),这样便克服了向成鼠体内导入 Cas9 蛋白的困难^[47]。利用此小鼠模型,采用腺病毒的形式向该 Cas9 小鼠中导入 Cre 重组酶, *TP53*、*KRAS* 和 *LKB1* 等与癌症相关基因的 sgRNA 以及用来编辑 *KRAS* 基因的同源臂,致多基因发生突变,最终在小鼠体内诱导出了肺癌,此小鼠模型也在胰腺癌模型的构建中得到应用^[44]。该小鼠模型已经成为肿瘤发生机制、新防治手段的研发及基因组学重要的工具鼠。

对于大动物来说,虽然随着高效基因编辑技术的出现,使利用细胞基因修饰后再进行体细胞核移植来制作基因修饰大动物技术链条中,其上游体细胞的基因打靶的低效率不再是制约基因修饰模型猪制备的技术瓶颈,但由于受其他诸多因素的影响,例如:供核细胞质量,卵细胞质量,胚胎移植,受体质量,体细胞核重编程等,其下游体细胞克隆效率依然很低(0.5% ~ 2%),只有很少一部分体细胞核移植胚胎能够发育成存活个体,利用体细胞核移植技术制备克隆猪模型是耗时、耗力、成本高的工作。因此,亟需构建能够正常、长期、稳定、高效地体内调控特定组织特定基因或多基因的表达的猪模型。为了绕过这一障碍,我们已经把 Cas9 插入到猪基因组的 *Rosa26* 位点,构建新型条件性表达 Cas9 基因工具猪模型,然后在 Cas9 基因工具猪的特定组织导入靶向目的基因 gRNA 的载体,使特定组织发生条件性多基因突变,获得的大动物模型。我们获得了条件性表达 Cas9 的基因修饰猪,不仅解决了 Cas9 基因转运问题,也绕过了体细胞核移植技术制备克隆猪模型耗时耗力,成本高的障碍,只需将包装的含有靶向特定基因的 gRNA 和 Cre 重组酶的腺病毒或慢病毒注射到这种工具猪的特定组织,即可实现成体大动物成体细胞发生条件性多基因编辑(未发表)。通过这种方法可以获得各种大动物疾病模型,尤其是癌症模型。例如:通过注射靶向神经疾病相关基因的 gRNA 的病毒至脑中,可构建神经退行性疾病模型;注射靶向肿瘤相关基因的 gRNA 注射到各个组织,可构建各种组织原发性肿瘤。

6 结语

以上我们介绍了几种基因修饰工具猪模型,一方面显示在技术上培育这种模型已没有障碍,另一

方面,也展示了重要的应用前景。这得益于近年来,以 CRISPR/Cas9 为代表的基因编辑技术的快速发展^[48]。但与小鼠相比,其种类和应用范围相差甚远。这是由于基因修饰工具猪的培育和应用中仍面临诸多的问题,迄今具有生殖系嵌合能力的猪胚胎干细胞和诱导多能干细胞仍未成功建立,基因修饰猪的制备主要依赖于体细胞核移植和胚胎注射技术,其极低的效率。再加之,相对于小鼠模型,尽管猪作为动物模型有诸多优势,但猪的生殖周期长,饲养和繁殖成本,需要特殊饲养环境的猪,如免疫缺陷猪需要 SPF 级饲养,其维持成本尤其高昂,运输流通难度大,限制了其像小鼠一样在基础研究的领域大规模应用。另外,目前对猪的基因修饰操作主要是单一的转基因修饰或基因靶向修饰,如要将基因修饰工具猪模型的推向更广泛的应用,多重基因修饰和更为复杂的条件性基因修饰工具猪的培育有待加以研究。

参 考 文 献

- [1] Szabo PE, Hubner K, et al. Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells [J]. *Mech-Dev*, 2002, 115(1-2):157-160.
- [2] Kos CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models [J]. *Nutr Rev*, 2004, 62(6):243-246.
- [3] Aryee KE, Shultz LD, Brehm MA. Immunodeficient mouse model for human hematopoietic stem cell engraftment and immune system development [J]. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2014, 1185:267-278.
- [4] Fan NN, Lai LX. Genetically modified pig models for human diseases [J]. *J Genet Genom*, 2013, 40(2):67-73.
- [5] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, et al. Rapid "Open-Source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification [J]. *Mol Cell*, 2008, 31(2):294-301.
- [6] Chen FQ, Pruett-Miller SM, Huang YP, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(9):753-U796.
- [7] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, 326(5959):1509-1512.
- [8] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, 326(5959):1501-1501.
- [9] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823.
- [10] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121):823-826.
- [11] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell-line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem-cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78(12):7634-7638.
- [12] Ezashi T, Telugu B, Alexenko AP, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(27):10993-10998.
- [13] Wu Z, Chen JJ, Ren JT, et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system [J]. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(1):46-54.
- [14] Esteban MA, Xu JY, Yang JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(26):17634-17640.
- [15] Hall VJ, Christensen J, Gao Y, et al. Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during early development [J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(8):2014-2024.
- [16] Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, et al. Germline-specific expression of the Oct4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice [J]. *Dev Growth Diff*, 1999, 41(6):675-684.
- [17] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4):663-676.
- [18] Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, et al. Development of a noninvasive monitoring system for evaluation of Oct-3/4 promoter status in miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos [J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(6):661-669.
- [19] Nowak - Imialek M, Kues WA, Petersen B, et al. Oct4-enhanced green fluorescent protein transgenic pigs: a new large animal model for reprogramming studies [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(9):1564-1576.
- [20] Huang LZ, Fan NN, Cai J, et al. Establishment of a porcine Oct-4 promoter-driven EGFP reporter system for monitoring pluripotency of porcine stem cells [J]. *Cell Reprogramm*, 2011, 13(2):93-98.
- [21] Lai SS, Wei S, Zhao BT, et al. Generation of knock-in pigs carrying Oct4 - tdTomato reporter through CRISPR/Cas9 - mediated genome engineering [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):12.
- [22] Li L, Pang DX, Wang TD, et al. Production of a reporter transgenic pig for monitoring Cre recombinase activity [J]. *Biochem-Biophys Res Commun*, 2009, 382(2):232-235.
- [23] Chen L, Li L, Pang D, et al. Construction of transgenic swine with induced expression of Cre recombinase [J]. *Animal*, 2010, 4(5):767-771.
- [24] Luo WW, Li ZJ, Huang YY, et al. Generation of AQP2-Cre transgenic mini-pigs specifically expressing Cre recombinase in kidney collecting duct cells [J]. *Transgenic Res*, 2014, 23(2):365-375.
- [25] Li XP, Yang Y, Bu L, et al. Rosa26 - targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing [J]. *Cell Res*, 2014, 24(4):501-504.
- [26] Li S, Flisikowska T, Kurome M, et al. Dual fluorescent reporter pig for Cre recombination: transgene placement at the ROSA26 lo-

- cus [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):8.
- [27] Kong QR, Hai T, Ma J, et al. Rosa26 locus supports tissue-specific promoter driving transgene expression specifically in pig [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):9.
- [28] Ruan JX, Li HG, Xu K, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:10.
- [29] Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5):2731-2738.
- [30] Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9):3507-3512.
- [31] Facci MR, Auray G, Buchanan R, et al. A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs [J]. *Immunology*, 2010, 129(3):396-405.
- [32] Mair KH, Sedlak C, Kaser T, et al. The porcine innate immune system: An update [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45(2):321-343.
- [33] Dawson HD, Loveland JE, Pascal G, et al. Structural and functional annotation of the porcine immunome [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14:16.
- [34] Mendicino M, Ramsoondar J, Phelps C, et al. Generation of antibody- and B cell-deficient pigs by targeted disruption of the J-region gene segment of the heavy chain locus [J]. *Transgenic Res*, 2011, 20(3):625-641.
- [35] Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, et al. Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6):753-758.
- [36] Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, et al. Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):8.
- [37] Lee K, Kwon DN, Ezashi T, et al. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20):7260-7265.
- [38] Huang J, Guo XG, Fan NN, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency [J]. *J Immunol*, 2014, 193(3):1496-1503.
- [39] Villa A, Santagata S, Bozzi F, et al. Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome [J]. *Cell*, 1998, 93(5):885-896.
- [40] Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver [J]. *Nature*, 2014, 514(7522):380-384.
- [41] Blasco RB, Karaca E, Ambrogio C, et al. Simple and rapid in vivo generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology [J]. *Cell Reports*, 2014, 9(4):1219-1227.
- [42] Maddalo D, Machado E, Concepcion CP, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system [J]. *Nature*, 2014, 516(7531):423-427.
- [43] Sanchez-Rivera FJ, Papagiannakopoulos T, Romero R, et al. Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing [J]. *Nature*, 2014, 516(7531):428-431.
- [44] Chiou SH, Winters IP, Wang J, et al. Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and in vivo CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing [J]. *Genes Devel*, 2015, 29(14):1576-1585.
- [45] Maresch R, Mueller S, Veltkamp C, et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice [J]. *Nature Commun*, 2016, 7:10770.
- [46] Matano M, Date S, Shimokawa M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids [J]. *Nature Med*, 2015, 21(3):256-262.
- [47] Platt RJ, Chen SD, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling [J]. *Cell*, 2014, 159(2):440-455.
- [48] 贾良杰. CRISPR/Cas 基因组靶向编辑技术综述 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(22):154-156.

[收稿日期] 2016-10-26