

程春雨,段翔,李颜. 人源化小鼠在呼吸道病原研究中的应用与发展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 267-273.

Cheng CY, Duan X, Li Y. Application and development of humanized mice for respiratory pathogen research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 267-273.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.016

人源化小鼠在呼吸道病原研究中的应用与发展

程春雨,段翔,李颜*

(模式动物与疾病研究教育部重点实验室,蛋白质与多肽药物教育部工程研究中心,医药生物技术国家重点实验室,南京大学化学与生物医药创新研究院,医学院模式动物研究所,南京 210061)

【摘要】 小鼠模型对于呼吸道病原的研究有着重要意义。然而进化所带来的肺及免疫系统的物种差异,使小鼠模型难以精准模拟人体的呼吸道病原感染。通过构建免疫系统人源化小鼠,可更好地再现人体免疫系统对呼吸道病原感染的应答。构建肺组织人源化小鼠和肺/免疫系统双人源化小鼠可实现人特异性的呼吸道病原感染及其免疫响应。本综述将从免疫系统、肺、肺/免疫系统双人源化3个方面,回顾人源化小鼠在人类呼吸道病原研究方面的进展。

【关键词】 人源化小鼠;呼吸道病原;肺;免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0267-07

Application and development of humanized mice for respiratory pathogen research

CHENG Chunyu, DUAN Xiang, LI Yan*

(MOE Key Laboratory of Model Animals for Disease Study. MOE Engineering Research Center of Protein and Peptide Medicine. the State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology. Chemistry and Biomedicine Innovation Center. Model Animal Research Center, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210061, China.)

Corresponding author: LI Yan. E-mail: yanli@nju.edu.cn

【Abstract】 Mouse models are of great interest for studying human respiratory pathogens. However, evolutionary species divergence has led to differences in lung structure and the immune system between humans and mice, making the study of human respiratory pathogens in mouse models a longstanding challenge. In contrast, mice with a humanized immune system can faithfully reproduce human immune responses to respiratory pathogen infection, and mice with humanized lung and lung-immune systems can be used to examine human trophic respiratory pathogen infection and the corresponding immune responses. This review summarizes the contributions and recent progress of these types of humanized mice in respiratory pathogen research.

【Keywords】 humanized mice; respiratory pathogens; lung; immunity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

世界卫生组织 (WHO) 的报告显示,呼吸系统疾病是 2019 年全球最主要的三大死亡原因之一,其中

下呼吸道感染仍然是世界上最致命的传染病,排在人类十大主要死亡原因的第四位^[1]。合适的动物

【基金项目】 国家重点研发计划青年项目 (2019YFA0802900), 国家自然科学基金 (32070942, 32122035), 江苏省双创计划。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2019YFA0802900), National Natural Science Foundation of China (32070942, 32122035), Program for Innovative Talents and Entrepreneur in Jiangsu.

【作者简介】 程春雨 (1997—), 博士研究生, 研究方向: 器官人源化小鼠模型。Email: chengcy@nicemice.cn

【通信作者】 李颜 (1985—), 教授, 博士生导师, 研究方向: 人源化小鼠模型、人源病毒感染、肿瘤免疫治疗及人免疫细胞发育。

Email: yanli@nju.edu.cn

模型不仅能够加速呼吸道病原致病机制的研究,更能为呼吸道病原的预防与治疗提供评价工具。目前已用于呼吸道病原研究的实验动物有很多,例如小鼠、大鼠、豚鼠、雪貂和非人灵长类动物等。小鼠因具有容易饲养且饲养成本低和繁殖快等优点,被广泛应用于科学研究。遗传背景均一、实验结果一致的近交系小鼠更是研究基因功能或疾病机制的首选。然而小鼠与人之间存在的物种差异,导致人鼠肺及免疫系统有所不同,从而使一些人源呼吸道病原无法直接感染小鼠,或者造成在小鼠与临床显著不同的病理与免疫特征。为了能更有效地研究和治疗呼吸道病原感染,免疫系统人源化小鼠、肺人源化小鼠、肺/免疫系统双人源化小鼠等模型在过去半个世纪逐渐发展和成熟。

1 免疫系统人源化小鼠

免疫系统人源化小鼠主要指将人的造血干细胞注射到免疫缺陷小鼠体内,然后在小鼠体内发育出人免疫细胞谱系的小鼠模型。早在 1980 年,研究人员就发现了重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠品系——CB17-Prkdc^{scid},该小鼠 T 细胞和 B 细胞均存在严重缺陷,胸腺和外周淋巴组织严重萎缩。而后在 1988 年,McCune 等^[2]在 SCID 小鼠中植入人胎肝来源的造血干细胞和人体胸腺组织,构建出了 SCID 人源化小鼠。SCID 人源化小鼠虽然支持人类 T、B 细胞分化,但存在“泄露”——即小鼠随着年龄增长发育出自体 T、B 细胞。后来,研究人员观察到具有非肥胖糖尿病(non-obese diabetes, NOD)的 NOD-SCID 小鼠具有更强的支持人类造血干细胞植入的能力,原因是 NOD 品系中小鼠巨噬细胞的信号调控蛋白 α (Sirpa) 具有突变,削弱了小鼠巨噬细胞对人类细胞的吞噬作用^[3-4]。但 NOD-SCID 人源化小鼠仍保留部分小鼠 NK 细胞,且也存在“泄露”的情况。此后研究人员一直在寻求人源化小鼠背景品系上的突破。2002 年,研究者发现突变白细胞介素 2(IL-2)受体共同 γ 链(IL2rg),可导致小鼠 NK 细胞活性的丧失和 T、B 淋巴细胞谱系的消失。据此,研究人员构建了 NOD-SCID IL2rg^{tm1sug}(NOG)小鼠品系^[5]。随后,研究人员用完整的无效等位基因替代小鼠的 IL2rg,在此基础上构建了 BRG、NSG 等小鼠品系。以 NOG、BRG 和 NSG 为背景构建的免疫系统人源化

小鼠,表现出稳定的人免疫细胞的定植与分化能力,过去十几年在人源病原感染以及肿瘤免疫治疗中发挥着越来越重要的作用。

1.1 结核杆菌

结核病(tuberculosis, TB)仍然是严重威胁人类健康安全的全局性传染病,然而唯一获得许可的结核疫苗卡介苗(Bacille Calmette-Guérin, BCG)的保护效力因人群和地区不同而不同^[6]。深入理解人体对结核分枝杆菌(myco bacterium tuberculosis, Mtb)的免疫应答,将帮助开发更有效的 TB 疫苗及治疗方案。目前,响应 Mtb 感染的核心免疫过程在不同动物模型中未能得到一致的结论。而通过免疫系统人源化小鼠则可直接观察人免疫系统对 Mtb 感染的响应,与临床更为相关和接近。

2013 年,2 个课题组相继报道了在免疫系统人源化小鼠鼻内感染 Mtb 可诱导肺肉芽肿形成^[7-8]。该病理特征与在结核病患者体内观察到的现象非常相似,表现为 T 细胞环绕着人巨噬细胞形成的坏死中心,并被大量成纤维细胞包围。同时,在没有免疫系统人源化的小鼠中则观察不到肺肉芽肿形成。值得一提的是,2013 年 Heuts 等^[7]发现 CD4⁺ T 细胞对结核分枝杆菌的感染具有意想不到的作用。他们发现人源化小鼠器官中的分枝杆菌数量高于非人源化对照,并且细菌负荷的增加是由人 CD4⁺ T 细胞介导。这一发现挑战了既往应用其他动物模型进行的 Mtb 研究,体现出免疫系统人源化小鼠模型的不可替代性,即探索人免疫系统在病原感染中的物种特异性反应。

免疫系统人源化小鼠也常被用来评价结核病疫苗,通过在免疫系统人源化 NOG 小鼠上接种卡介苗或 CpG-C(一种含有结核分枝杆菌抗原 ESAT-6 的脂质体制剂),研究人员观察到 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞分泌相关细胞因子,例如 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2^[9]。与 C57BL/6 小鼠和 Hartley 豚鼠相比,人源化小鼠模型提供了疫苗可以进一步诱导人类 T 细胞免疫反应的证据。此外关于结核病疫苗的开发方面,人源化小鼠也可以作为新型疫苗的评价平台。此前一项研究中,研究人员从 50 个预测多肽中筛选出 6 个免疫优势肽,构建了一种新的多肽疫苗,命名为 MP3RT^[10]。免疫系统人源化 NSG 小鼠经 MP3RT 免疫后,IFN- γ 的分泌、CD3⁺ IFN- γ ⁺ T 细胞和 MP3RT 特异性 IgG 抗体均显著增加,证明 MP3RT 是一种有潜力的多肽结核疫苗。

1.2 流感病毒

在流感研究方面,特定基因敲除小鼠模型和人类基因转基因小鼠模型被广泛应用于研究某一基因在流感病毒感染中的作用。而免疫系统人源化小鼠模型则可以用来测试人免疫系统对疫苗及治疗的响应等^[11]。

理想的疫苗能够诱导长期免疫记忆,并产生高滴度、广谱性的中和抗体。然而,由于甲型流感病毒包膜抗原 HA 的序列变异,甲型流感病毒的多个亚型已经进化,使疫苗的开发变得困难。例如, H7N9 亚型流感疫苗对人类的免疫原性始终低于其他亚型的疫苗^[12]。针对这一问题, Wada 等^[13]修饰了 H7 特异性 T 细胞表位中的关键残基,然后在以 NOD-SCID/*Jak3*^{null} (由于缺乏 IL-2R 介导的 *Jak3* 信号传导从而导致 NK 细胞发育受损)为基础品系构建的免疫系统人源化小鼠上进行了测试,他们发现免疫后的人源化小鼠中 IgG 结合 HA 的能力和强度有所改善,证明 H7N9 免疫原性弱是由于其特异性的 T 细胞表位所导致的,同时体现了人源化小鼠模型可以模拟人免疫细胞对不同抗原表位的响应能力,并且是探究不同流感病毒亚型的感染过程及免疫系统应答的优秀模型。此外,使用不同策略开发的疫苗,包括抗病毒 DNA 疫苗,也可以在免疫系统人源化小鼠模型中进行测试。研究者根据人单核细胞上的 *FcγRI* 可增强体内抗原呈递的原理,将编码抗人 *FcγRI* 单链可变抗体(scFv)的序列与编码含有 T、B 细胞表位的甲型流感病毒血凝素亚基间肽(hemagglutinin intersubunit peptide)的序列偶联,再将其构建到真核表达载体系统 pTriEx-3 Neo 中^[14]。免疫系统人源化 NOD-SCID *IL2rg*^{null} 小鼠注射该嵌合载体分子后,可以产生抗流感的 IgG 和流感特异性的细胞毒性 T 细胞。

为了在人源化小鼠体内能够更好地模拟人体抗病毒反应,研究者通过基因工程手段进一步改造免疫缺陷小鼠品系,用不同的 HLA 单倍型取代小鼠 MHC I 类和 II 类分子,从而使人 T 细胞在小鼠胸腺中能够正确发育成熟。例如,2016 年 Majji 等^[15]开发了名为“DRAGA”的免疫缺陷小鼠品系,同时表达人 II 类分子 HLA-DR4 和 I 类分子 HLA-A2。而后研究发现针对 H1N1 血凝素蛋白的人单克隆抗体能够清除免疫系统人源化 DRAGA 小鼠的流感病毒^[16]。另一项研究展示了人源化 DRAGA 小鼠可以支持 H1N1 和 H3N2 甲型流感病毒的感染,且被

感染的人源化 DRAGA 小鼠可以产生抗病毒中和抗体和驻肺的 CD103⁺T 细胞^[17]。这些结果表明,人源化 DRAGA 小鼠甲型流感病毒感染模型可以产生与人类相似的肺部病理表现和抗病毒免疫反应。

2 肺人源化小鼠

小鼠作为临床前模式动物有着诸多的优势,但人鼠之间数百万年的进化隔离,物种差异造成一些人源呼吸道病原不能感染小鼠,例如新型冠状病毒(SARS-CoV-2)。新型冠状病毒肺炎的爆发,对全球公共卫生及经济都造成了巨大损失,直至现在仍严重威胁着全世界人民的生命健康与安全。通过对小鼠进行改造,例如基因人源化、人肺组织异位移植及人-鼠肺嵌合等方法,可以实现利用小鼠模型对人源呼吸道病原进行研究。

2.1 基因人源化

为了克服物种特异性障碍,将人类受体蛋白通过转基因或者腺病毒转导的方式在小鼠中表达,可使小鼠对人源呼吸道病原易感。转基因动物是指将外源重组基因整合到宿主基因组且稳定表达,并可遗传的一类动物。转基因小鼠往往存在构建时间长、繁育周期长等问题,但一旦构建完成,可通过繁育大规模生产。而采用腺病毒转导方式构建人源化小鼠的技术方法简单,周期短(2~3周),可在多种基因修饰背景鼠上进行构建,但转导的基因不能遗传给后代,因此需要重复构建。两种基因人源化方法各有优势,适用于不同条件下的实验设计。以冠状病毒为例,根据其遗传学差异和血清学特性可将冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 和 δ 四个属,其中可感染人的主要是 α 属中的 HCoV-229E 与 HCoV-NL63,以及 β 属中的 HCoV-OC43、HCoV-HKU1、严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)和 SARS-CoV-2^[18]。除 HCoV-OC43 外^[19],其余人冠状病毒均不可以很好地感染普通小鼠。因此,为了更好地研究人冠状病毒的致病机制以及开发相关疫苗和抗病毒药物,研究者们开发了一系列基因人源化小鼠。

ACE2 是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的共同受体,同时也是研发新冠疫苗及治疗药物的重要靶点。2007 年,3 个课题组几乎同时对 hACE2 转基因小鼠进行了报道。这些转基因小鼠模型的主要差别在于应用不同的启动子以驱动人 ACE2 在小鼠组织中特异表达,包括上皮细胞 *Krt18* 启动子、小鼠内

源性 ACE2 启动子以及外源性的复合启动子 CAG (带有 CMV-IE 增强子的鸡 β -肌动蛋白启动子) 等^[20-22]。2016 年, Menachery 等^[23]利用肺纤毛上皮细胞启动子 HFH4 构建了 HFH4-hACE2 转基因小鼠。所有这些转基因小鼠都易感 SARS-CoV, 但是无论采取何种表达策略, 在 SARS-CoV 研究中, 小鼠都死于病毒感染大脑, 而大脑感染在临床中极少观察到。在新型冠状病毒肺炎爆发后, 这些在 SARS 感染小鼠模型构建上积累的经验也很快被应用于新冠病毒研究^[24-26]。这些模型同样支持 SARS-CoV-2 的感染, 但由于它们在人 ACE2 的表达上存在差异, 最终的感染程度也不尽相同。其中, 较高剂量的 SARS-CoV-2 鼻内接种会导致 K18-hACE2 小鼠死亡, 并对包括肺、肝和肾在内的各种器官造成严重损害, 而较低剂量感染则引起的损伤症状较轻^[27], 在大多数组织中表现为剂量依赖性效应, 与临床表型较为类似。因此, K18-hACE2 模型似乎是迄今为止报道的最敏感、最接近临床表型的新冠小鼠模型。除 hACE2 转基因小鼠外, 2020 年 6 月, Sun 等^[28]将表达人 ACE2 的腺病毒在鼠肺中转导, 快速建立了首个新冠肺炎非转基因小鼠模型。该小鼠在感染 SARS-CoV-2 后, 肺中可检测到高滴度的新冠病毒, 并出现相应的肺炎症状和病理特征。

2012 年, MERS 爆发后, Zhao 等^[29]率先应用表达 MERS-CoV 受体的人 DPP4 腺病毒构建了 MERS-CoV 易感小鼠, 并且证明这些小鼠可用于评估 MERS 疫苗和抗病毒疗法。随后 Agrawal 等^[30]于 2015 年构建了在 CAG 启动子控制下表达 hDPP4 的转基因小鼠, 该小鼠感染 MERS-CoV 几天后出现了体重持续减轻和死亡。2017 年, 研究人员又开发了另一种 hDPP4 转基因小鼠, 并证明 MERS-CoV 感染引起的致命性肺炎具有病毒载量依赖性^[31]。目前, 针对 4 种低致病性人冠状病毒 (HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU1) 小鼠模型构建方面的研究还相对比较少。2005 年, Lassnig 等^[32]报道了针对 229E 受体 APN 人源化的转基因小鼠, 但是免疫健全的 hAPN 转基因小鼠却对 229E 不易感, 而当小鼠同时存在 Stat1 缺陷时, 可检测到病毒在肺部和肠道的大量复制。提示对一些人源呼吸道病原来说, 仅仅将感染受体人源化还不能够完全支持病原在小鼠中感染。

2.2 组织异位移植

尽管可以通过基因人源化对小鼠进行改造, 使

其适应人源呼吸道病毒的感染, 但人鼠的物种差异性可能会导致利用小鼠模型产生与临床相矛盾的结果。因此, 直接利用人体器官或组织研究病毒感染或许更是更优的选择。

在过去的几十年中, 通过移植一种或多种人体组织或细胞到小鼠体内的方法已被广泛用于 HIV、HBV、HCV 和其他重要病原体的研究。早在 1994 年, 已有将 8 ~ 12 周的人胎肺组织植入免疫缺陷 SCID 小鼠的肾包囊或者皮下的报道, 结果显示异位移植的人胎肺组织可快速生长发育, 并分化成与正常人肺相似的结构^[33]。2012 年, De Paepe 等^[34]通过比较移植的部位 (肾包膜下和皮下), 证明肾包囊移植更有利于人胎肺组织微血管的重塑。同年, Maidji 等^[35]同样将胎肺组织移植入免疫缺陷 SCID 小鼠肾包膜下, 并向其直接注射人巨胞病毒 (HCMV) 临床分离株, 发现 HCMV 能感染人肺泡上皮和间充质细胞, 并在 2 周内有效地在肺移植组织中复制, 导致大量病变。水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 和 HCMV 一样, 感染具有种属限制。2017 年, Wang 等^[36]利用人肺肾包囊移植小鼠模型证实异位移植的人肺组织也可支持 VZV 的感染。而 2019 年 Wahl 等^[37]报道了人肺皮下移植小鼠模型 (LoM), 结果显示 LoM 可支持例如 MERS-CoV、RSV、HCMV 和寨卡病毒等人源病毒的感染和复制。以上结果表明, 这种在免疫缺陷鼠上异位移植的人肺组织理论上可支持所有人源呼吸道病原的感染, 或许可作为今后呼吸道病原感染的通用模式动物, 包括 SARS-CoV-2。Wahl 等^[38]于 2021 年将 LoM 应用于新冠研究, 结果显示 SARS-CoV-2 在人肺移植组织中主要感染人肺上皮细胞, 如肺泡中的 2 型肺泡细胞 (hAEC2s) 和气道中的纤毛细胞, 而 EIDD-2801 (一种目前处于 II/III 期临床试验的口服广谱抗病毒药物) 的治疗和预防给药能显著抑制 SARS-CoV-2 在肺移植组织中的复制。同年, 厦门大学的夏宁邵团队通过同样的构建策略, 也证实了异位移植的人肺组织可支持 SARS-CoV-2 的感染和复制^[39]。

2.3 人-鼠肺嵌合

通过皮下或肾包囊异位移植的人胎肺组织虽然可以生长发育, 形成人肺类似结构, 但其不具备正常肺组织气体交换的生理功能。因此, 无法利用该小鼠模型研究呼吸道病原的传播和流行动力学等。为了维持人肺细胞的生理功能, 可在鼠肺原位嵌合人肺细胞, 构建人-鼠肺嵌合小鼠模型。构建

人-鼠肺嵌合与构建肝嵌合小鼠的思路相类似,都需要先对鼠源细胞进行破坏,从而为植入的人源细胞提供生长空间。然而,肝细胞的组成较为均一,可通过自身肝细胞基因缺陷或者转入毒性基因等造成鼠源肝细胞损伤。而肺细胞组成复杂,难以利用基因工程方法同时损伤多种鼠肺细胞。因此,研究人员往往通过感染 H1N1 流感病毒和给予萘^[40]以及博来霉素^[41]这两种化学药物来诱导小鼠肺损伤。其中萘诱导的损伤较为特异,基本只针对 Club 细胞,而博来霉素较为广谱,可同时诱导气道和肺泡细胞损伤。

通常情况下,可以通过静脉注射或者气管滴注的方式移植人肺细胞。目前,可用于移植的人肺细胞主要有肺干细胞、人胎肺细胞和胚胎干细胞(ESCs)或诱导多能干细胞(iPSCs)定向分化的肺样细胞等。慢性阻塞性肺病(COPD)是一种以慢性支气管炎和/或肺气肿为特征的疾病,最终可发展为肺心病和呼吸衰竭。Wang 等^[42]通过移植表达转录因子 p63 和角蛋白-5(Krt5)的远端气道干细胞(DASC)到 COPD 小鼠中,证实移植人 DASCs 可以减轻 COPD 小鼠肺部炎症和肺气肿。而 hAEC2s 同样具有肺干细胞特性,Kathirya 等^[43]通过将 hAEC2s 移植到博来霉素诱导损伤的 NSG 小鼠肺部,10 d 后可在肺泡受损区域检测到人细胞团。ESCs 或 iPSCs 具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性,可体外定向诱导分化至肺细胞谱系。Soh 等^[44]通过干细胞标记物 CD166 进一步富集 hESCs 分化产生的肺上皮细胞(LEC),可以在 LEC 移植后提高肺损伤 NOD-SCID 小鼠的生存能力并改善其肺功能。胎肺细胞因其处于生长发育阶段,因此也具备一定的干细胞潜能。2015 年,Rosen 等^[45]将 20 ~ 22 周人胎肺单细胞悬液静脉输注到萘损伤和辐照的 SCID 小鼠中,7 周后在鼠肺中检测到 3%左右的人肺嵌合。但目前应用人-鼠肺嵌合模型来研究呼吸道病原感染的报道还比较少,一个可能的原因是人肺嵌合的比例还有待提升。

3 肺/免疫系统双人源化小鼠

病原感染的预防和治疗通常与先天性和适应性免疫有关,由于单纯的肺人源化小鼠模型缺乏人的免疫细胞,限制了其在病原感染所引发的免疫反应方面的研究。所以在肺人源化小鼠模型的基础上,进一步通过移植人的免疫细胞,可以建立肺/免

疫系统双人源化小鼠模型。

近日,耶鲁大学 Flavell 团队利用腺病毒将人 ACE2 转导到人源化 MISTRG6 小鼠的肺部,建立了 MISTRG6-hACE2 小鼠模型^[46]。研究人员应用该模型描述了 SARS-CoV-2 感染后长达 28 d 的人先天性和适应性免疫反应,表明被感染的小鼠具有新冠慢性感染的关键特征,包括体重减轻、病毒 RNA 持续性存在、T 淋巴细胞减少等,同时还利用该模型评估了患者来源的抗体和类固醇治疗对于控制新冠早期感染的重要作用。尼帕病毒(NiV)是一种人畜共患的副粘病毒,可引起人类致命的呼吸道疾病和脑炎。2014 年,伊拉斯姆斯大学 Rockx 团队通过人肺皮下移植模型证实了 NiV 病毒感染靶向人肺组织中的内皮和上皮,并形成合胞体^[47],但关于 NiV 病毒诱导急性肺损伤(ALI)的分子机制仍不是非常清楚。在之后的一项研究中,该团队在人肺组织皮下移植的基础上,结合了骨髓、肝和胸腺(BLT)免疫系统重建来研究 NiV 病毒^[48],结果显示人体免疫系统的存在可干扰 NiV 病毒传播,感染区域浸润的免疫细胞可产生大量的细胞因子和趋化因子。2019 年,Wahl 等^[37]利用同样的双人源化小鼠模型(BLT-L)感染 HCMV,观察到抗原特异性体液免疫应答和 T 细胞免疫反应。2021 年 Wang 等^[49]也利用类似的模型研究了 H1N1 流感病毒在肺/免疫系统双人源化小鼠中的感染,发现人肺移植感染 H1N1 后,组织驻留记忆 T 细胞显著增加,并产生病毒特异性 T 细胞和抗病毒 IgM 及 IgG。

4 展望

新冠爆发后,由于人鼠物种差异,原始毒株不能感染普通小鼠,因此基因人源化小鼠模型在新冠初期研究中发挥了不可替代的作用。而我国科学家与病毒也在争分夺秒赛跑,为新冠小鼠模型的研发作出了巨大贡献,如中国医学科学院医学实验动物研究所秦川研究员团队在全球率先报道了 hACE2 转基因小鼠模型^[24],而广州呼吸疾病国家重点实验室赵金存教授团队则利用腺病毒载体(Ad5)成功建立了首个非转基因新冠小鼠模型等^[28]。我国起步较晚,近年来虽有一定发展,但仍需继续努力,希望未来能吸引更多优秀的中国科学家加入人源化小鼠研究。

人源化小鼠在呼吸道病原致病机制研究、药物开发及疫苗评价等方面已有了诸多的应用,但是仍

存在许多不足,有许多地方需要改进。例如,免疫系统人源化小鼠的人 B 细胞发育和激活存在问题,导致产生的体液免疫反应较弱,难以产生抗原特异性高亲和力抗体。目前已有研究针对这一现状进行优化,如构建人 BAFF 和 IL-6 转基因小鼠,为人 B 细胞的发育和激活提供必需的细胞因子等。而基因人源化小鼠虽然可以使人源特异性病原感染小鼠,但转基因和腺病毒转导的方式都存在基因非特异性表达不能完全还原人体生理表达水平的现象,因此未来仍需要更深入地研究如何更精准地控制基因表达。皮下肺移植模型理论上可以感染所有人源呼吸道病原,结合免疫系统双人源化还可以研究病原感染后的免疫反应。但人肺移植无法模拟人正常的气体交换生理功能,即人肺细胞处于一种“功能不全”的状态。而人-鼠肺嵌合模型内的人肺细胞在鼠肺原位定植、发育,有希望参与到正常的气体交换中。但相关研究还比较少,且研究中所展示的人肺嵌合比例还比较低,有待进一步提高,可尝试诱导更强的肺损伤,移植重建功能更强的人肺细胞等。期望未来还会有更适合、更完善的人源化小鼠模型被不断地开发出来,应用于更多种类呼吸道病原的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death [R]. Geneva: WHO, 2020.
- [2] McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, et al. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function [J]. *Science*, 1988, 241(4873): 1632-1639.
- [3] Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1313-1323.
- [4] Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(11): 786-798.
- [5] Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, et al. Human hematolymphoid system mice: current use and future potential for medicine [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 635-674.
- [6] Gong W, Liang Y, Mi J, et al. Peptides-based vaccine MP3RT induced protective immunity against mycobacterium tuberculosis infection in a humanized mouse model [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 666290.
- [7] Heuts F, Gavier-Widén D, Carow B, et al. CD4+ cell-dependent granuloma formation in humanized mice infected with mycobacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 6482-6487.
- [8] Calderon VE, Valbuena G, Goetz Y, et al. A humanized mouse model of tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63331.
- [9] Grover A, Troy A, Rowe J, et al. Humanized NOG mice as a model for tuberculosis vaccine-induced immunity: a comparative analysis with the mouse and guinea pig models of tuberculosis [J]. *Immunology*, 2017, 152(1): 150-162.
- [10] Arrey F, Löwe D, Kuhlmann S, et al. Humanized mouse model mimicking pathology of human tuberculosis for in vivo evaluation of drug regimens [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 89.
- [11] Peiris JM, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans [J]. *Clin Virol*, 2009, 45(3): 169-173.
- [12] Mulligan MJ, Bernstein DI, Winokur P, et al. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: A randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2014, 312(14): 1409-1419.
- [13] Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, et al. A humanized mouse model identifies key amino acids for low immune genicity of H7N9 vaccines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1283.
- [14] Ivanova II, Mihaylova NM, Manoylov IK, et al. Targeting of influenza viral epitopes to antigen-presenting cells by genetically engineered chimeric molecules in a humanized NOD SCID gamma transfer model [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(9): 1056-1070.
- [15] Majji S, Wijayalath W, Shashikumar S, et al. Differential effect of HLA class-I versus class-II transgenes on human T and B cell reconstitution and function in NRG mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28093.
- [16] Mendoza M, Ballesteros A, Qiu Q, et al. Generation and testing anti-influenza human monoclonal antibodies in a new humanized mouse model (DRAGA: HLA-A2. HLA-DR4. Rag1 KO. IL-2R γ KO. NOD) [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2018, 14(2): 345-360.
- [17] Mendoza M, Gunasekera D, Pratt KP, et al. The humanized DRAGA mouse (HLA-A2. HLA-DR4. RAG1 KO. IL-2R g c KO. NOD) establishes inducible and transmissible models for influenza type A infections [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16(9): 2222-2237.
- [18] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [19] McIntosh K, Becker WB, Chanock RM. Growth in suckling-mouse brain of " IBV-like " viruses from patients with upper respiratory tract disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967, 58(6): 2268-2273.
- [20] McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-HACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Virol*, 2007, 81(2): 813-821.
- [21] Yang XH, Deng W, Tong Z, et al. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection [J]. *Comp Med*, 2007, 57(5): 450-459.
- [22] Tseng CT, Huang C, Newman P, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human

- Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor [J]. *J Virol*, 2007, 81(3): 1162–1173.
- [23] Menachery VD, Yount BL Jr, Sims AC, et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(11): 3048–3053.
- [24] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 830–833.
- [25] Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell*, 2020, 182(1): 50–58.
- [26] Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1327–1335.
- [27] Dong W, Mead H, Tian L, et al. The K18-human ACE2 transgenic mouse model recapitulates non-severe and severe COVID-19 in response to an infectious dose of the SARS-CoV-2 virus [J]. *J Virol*, 2022, 96(1): e0096421.
- [28] Sun J, Zhuang Z, Zheng J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. *Cell*, 2020, 182(3): 734–743.
- [29] Zhao J, Li K, Wohlford-Lenane C, et al. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(13): 4970–4975.
- [30] Agrawal AS, Garron T, Tao X, et al. Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease [J]. *J Virol*, 2015, 89(7): 3659–3670.
- [31] Li K, Wohlford-Lenane CL, Channappanavar R, et al. Mouse-adapted MERS coronavirus causes lethal lung disease in human DPP4 knockin mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(15): E3119–E3128.
- [32] Lassnig C, Sanchez CM, Egerbacher M, et al. Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(23): 8275–8280.
- [33] Péault B, Tirouvanziam R, Sombardier MN, et al. Gene transfer to human fetal pulmonary tissue developed in immunodeficient SCID mice [J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5(9): 1131–1137.
- [34] De Paepe ME, Chu S, Hall S, et al. The human fetal lung xenograft: validation as model of microvascular remodeling in the postglandular lung [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2012, 47(12): 1192–1203.
- [35] Maidji E, Kosikova G, Joshi P, et al. Impaired surfactant production by alveolar epithelial cells in a SCID-hu lung mouse model of congenital human cytomegalovirus infection [J]. *J Virol*, 2012, 86(23): 12795–12805.
- [36] Wang W, Pan D, Fu W, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of varicella-zoster virus infection [J]. *Antiviral Res*, 2017, 146: 45–53.
- [37] Wahl A, De C, Abad Fernandez M, et al. Precision mouse models with expanded tropism for human pathogens [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(10): 1163–1173.
- [38] Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801 [J]. *Nature*, 2021, 591(7850): 451–457.
- [39] Fu W, Wang W, Yuan L, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of SARS-CoV-2 infection [J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6607–6615.
- [40] Stripp BR, Maxson K, Mera R, et al. Plasticity of airway cell proliferation and gene expression after acute naphthalene injury [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(6): L791–L799.
- [41] Hay J, Shahzeidi S, Laurent G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage [J]. *Arch Toxicol*, 1991, 65(2): 81–94.
- [42] Wang X, Zhao Y, Li D, et al. Intrapulmonary distal airway stem cell transplantation repairs lung injury in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(6): e13046.
- [43] Kathiriya JJ, Wang C, Zhou M, et al. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 10–23.
- [44] Soh BS, Zheng D, Li Yeo JS, et al. CD166(pos) subpopulation from differentiated human ES and iPS cells support repair of acute lung injury [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(12): 2335–2346.
- [45] Rosen C, Shezen E, Aronovich A, et al. Preconditioning allows engraftment of mouse and human embryonic lung cells, enabling lung repair in mice [J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 869–879.
- [46] Sefik E, Israelow B, Mirza H, et al. A humanized mouse model of chronic COVID-19 [EB/OL]. (2021-02-26) [2021-12-17]. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01155-4>.
- [47] Valbuena G, Halliday H, Borisevich V, et al. A human lung xenograft mouse model of Nipah virus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(4): e1004063.
- [48] Escaffre O, Saito TB, Juelich TL, et al. Contribution of human lung parenchyma and leukocyte influx to oxidative stress and immune system-mediated pathology following Nipah virus infection [J]. *J Virol*, 2017, 91(15): e00275–17.
- [49] Wang Y, Wang L, Fu C, et al. Exploration of human lung-resident immunity and response to respiratory viral immunization in a humanized mouse model [J]. *J Immunol*, 2022, 208(2): 420–428.