

刘宇,陈恒伟,温悦婷,等. 基于 Tet-On 系统构建 Alb 启动子调控猪 uPA 转基因表达的慢病毒载体 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 23-28.

Liu Y, Chen HW, Wen YT, et al. Development of a single lentiviral vector containing an Tet-On system for hepatocyte-specific uPA transgene expression [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 23-28.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.004

基于 Tet-On 系统构建 Alb 启动子调控猪 uPA 转基因表达的慢病毒载体

刘宇¹, 陈恒伟¹, 温悦婷², 贾俊双², 林晓琳², 肖东^{1, 2*}

(1. 南方医科大学比较医学研究所暨实验动物中心, 广州 510515;

2. 南方医科大学肿瘤研究所, 广州 510515)

【摘要】 目的 应用 Tet-On 基因表达调控系统构建 Alb 启动子调控小型猪 uPA (pig urokinase-type plasminogen activator, puPA) 基因表达的慢病毒载体 pLVX-Alb-TetOne-TRE-puPA-T2A-CopGFP (pLATTPUTG)。 **方法** 首先将 pAlb-Cre-GH/BS 作为模板, PCR 扩增目的基因 Alb-enhancer/promoter, In-Fusion 克隆至 *Xho* I/*Xba* I 双酶切的 pLVX-TetOne 中, 获得 Alb 启动子替换 pLVX-TetOne 原有的 PGK 启动子的质粒 pLVX-Alb-TetOne; 接着以 pCD823 A-1 为模板, PCR 扩增 T2A-CopGFP, In-Fusion 克隆至 *Bam*H I/*Age* I 酶切的 pLVX-Alb-TetOne 中, 获得 pLVX-Alb-TetOne-TRE-T2A-CopGFP (pLATTTG); 最后以 H8803 为模板, PCR 扩增 puPA (3' 端含 Flag 标签), In-Fusion 克隆至 pLATTTG 中, 最终获得慢病毒载体 pLVX-Alb-TetOne-TRE-puPA-T2A-CopGFP (pLATTPUTG); 所构建的质粒均经酶切和测序鉴定。 pLATTPUTG 瞬转 293T 细胞, 转染 24 h 后倒置荧光显微镜检测绿色荧光; 随后六孔板内加入强力霉素 (Dox), 48 h 后倒置荧光显微镜下检测 CopGFP 表达 (包括未加 Dox 的孔), 接着收集细胞以抽提总 RNA 和总蛋白, 以用于 qRT-PCR 检测 puPA 和 CopGFP 表达及 Western blot 检测 Flag 表达。 **结果** 酶切鉴定和测序证实成功构建了慢病毒载体 pLATTPUTG。 pLATTPUTG 转染 293T 细胞, 24 h 后倒置荧光显微镜下未见绿色荧光, 而加入 Dox 48 h 后几乎所有细胞均发强的绿色荧光, 而不加 Dox 的孔内仍然未见绿色荧光; 加 Dox 的孔内细胞上 puPA、CopGFP 和 Flag 表达水平均显著升高, 而不加 Dox 的孔内细胞上检测到上述基因极低表达; 以上数据提示, 应用该 Tet-On 基因表达调控系统实现了 puPA 基因在 293T 细胞上可诱导性表达。 **结论** 成功基于 Tet-On 基因表达调控系统构建 Alb 启动子调控 puPA 转基因表达的慢病毒载体 pLATTPUTG, 这为相关后续研究奠定了坚实基础。

【关键词】 Alb 启动子; 小型猪 uPA; copGFP; Tet-On 基因表达调控系统; 慢病毒载体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 05-0023-06

Development of a single lentiviral vector containing an Tet-On system for hepatocyte-specific uPA transgene expression

LIU Yu¹, CHEN Hengwei¹, WEN Yueting², JIA Junshuang², LIN Xiaolin², XIAO Dong^{1, 2*}

(1. Institute of Comparative Medicine & Laboratory Animal Center, Southern Medical University,

Guangzhou 510515, China. 2. Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

【基金项目】 广东省科技计划项目 (2013B060300013, 2017A010105017)。

【作者简介】 刘宇 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 肝损伤动物模型开发与应用。 E-mail: liuyu809709521@126.com

【通信作者】 肖东 (1968—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为糖脂代谢和人源化肝脏动物模型 (鼠和小型猪等) 开发与应用。

E-mail: xiao_d@hotmail.com

【Abstract】 Objective To develop a lentiviral vector containing a Tet-On system for inducible pig urokinase-type plasminogen activator (puPA) transgene expression under the control of the albumin (Alb) promoter, and to confirm the *in vitro* functionality of the resulting plasmid. **Methods** First, the fragment of the Alb-enhancer/promoter was amplified from pAlb-Cre-GH/BS and subsequently inserted into the *Xho*I and *Xba*I sites of pLVX-TetOne by In-Fusion cloning to generate pLVX-Alb-TetOne. Second, the T2A-CopGFP fragment was amplified from pCD823 A-1 and then subcloned into pLVX-Alb-TetOne by In-Fusion cloning to construct pLVX-Alb-TetOne-TRE-T2A-CopGFP (pLATTTG). Finally, the puPA fragment was amplified from H8803 and subsequently inserted into pLATTTG by In-Fusion cloning to produce pLVX-Alb-TetOne-TRE-puPA-T2A-CopGFP (pLATTPUTG). To validate the *in vitro* functionality of the resulting vector (pLATTPUTG), it was transiently transfected into 293T cells, followed by CopGFP assay under an inverted fluorescence microscope at 24 h after transfection in the absence of doxycycline (Dox-). Dox was then added into a 6-well plate, and the CopGFP assay was performed at 48 h after the addition of Dox, followed by testing the expression of puPA, CopGFP and Flag by qRT-PCR or western blot. **Results** The data from enzyme digestion and DNA sequencing demonstrated that pLATTPUTG was successfully constructed. In the presence of Dox, most cells transfected with pLATTPUTG showed strong green fluorescence and a high-level expression of puPA, CopGFP and Flag, whereas in the absence of Dox, no cells transiently transfected with pLATTPUTG displayed green fluorescence. **Conclusions** A lentiviral vector containing a Tet-On system for inducible puPA transgene expression under the control of an Alb promoter was successfully generated, which will lay a solid foundation for further study.

【Keywords】 albumin (Alb) promoter; puPA (pig urokinase-type plasminogen activator); CopGFP; Tet-On system; lentivirus vector

肝脏疾病(如病毒性肝炎、脂肪肝、肝纤维化、肝硬化和肝癌等)是威胁人类健康的最严重的疾病之一^[1]。理想动物模型的缺乏在很大程度上制约了肝脏相关疾病研究和新药筛选等,而肝人源化的小鼠模型或人-鼠嵌合肝小鼠模型在各种肝脏相关疾病发病机制研究和药物筛选等方面已展示出中巨大的应用价值^[1-3]。但是与小型实验动物(如小鼠)相比,大型实验动物(如小型猪)在生物医学研究中具有独特优势。首先,其在解剖、生理、生化代谢和疾病发生等方面与人类相似,体型适中,器官尺度与人的接近,有利于手术操作;再者寿命达 10 年以上,便于研究的长期追踪^[4]。创制肝人源化猪模型的先决条件之一是拥有肝损伤的猪模型。已有研究表明,在 Alb-uPA 转基因小鼠肝中特异过表达尿激酶型纤溶酶原激活因子(urokinase plasminogen activator, uPA)转基因,可使小鼠发生肝损伤;移植小鼠原代肝细胞可有效在受损的 Alb-uPA 小鼠肝上重建小鼠的肝^[5-7]。亦有研究者应用 SCID/Alb-uPA 免疫缺陷和肝损伤的小鼠模型移植人肝细胞,成功在受损的鼠肝上重建了人的肝,嵌合肝中人肝细胞嵌合率高达 80%~90%,甚至接近 100%^[8-10]。Alb-uPA 小鼠作为肝损伤模型具有以下不足:新生小鼠死亡率高,繁殖困难;肝细胞移植手术的窗口期短,需要在小鼠出生后二周内进行,移植技术难度大,死亡率高等缺点^[1-3]。四环素基

因表达调控系统(包括 Tet-on 系统和 Tet-off 系统)是迄今为止在体内和体外应用最为成功和最为广泛的调控系统之一^[11-12]。有鉴于此,我们拟结合 Tet-on 基因表达调控系统和 Alb 启动子,建立可诱导和肝特异过表达猪 uPA 的转基因小型猪,以最终创制药物(强力霉素, Dox)可调控的高效肝损伤猪模型;该模型借助 Tet-on 系统,可通过 Dox 诱导 uPA 于肝特异激活,引起猪的肝损伤。该药物可调控的肝损伤猪模型与免疫缺陷猪交配,获得免疫缺陷的诱导型肝损伤模型,该模型通过移植人肝细胞,可获得真正意义上的肝人源化的猪模型。目前,慢病毒载体法已成功用于制备转基因猪和转基因猴^[13]。本文主要研究目的在于基于 Tet-on 系统构建白蛋白(albumin, Alb)启动子调控猪 uPA 转基因表达的慢病毒载体,并对载体的功能和 Tet-on 系统工作的有效性进行验证,为借助慢病毒载体法制备 uPA 转基因猪,并进而创制药物可调控的肝损伤猪模型奠定坚实基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 载体

携带肝特异性 Alb 启动子的质粒载体 pAlb-Cre-GH/BS 受赠于美国 Mark A. Magnuson 教授^[14],携带 puPA 基因片段的 H8803 质粒以基因合成方式

购自和元生物技术(上海)股份有限公司,携带 all-in-one Tet-On[®] 3G 系统的 pLVX-TetOne 购自 TaKaRa 公司,携带 T2A-CopGFP 基因片段的慢病毒载体 pCD823A-1 购自 System Biosciences (SBI) 公司。

1.1.2 细胞

293T 细胞来源和培养方法等参见文献^[15]。

1.2 主要试剂与仪器

2× rTag Master Mix 购自广州艾基生物科技有限公司;限制性内切酶和 In-Fusion 克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒小量提取试剂盒购自广州东盛生物科技有限公司;脂质体转染剂 Lipofectamine3000、高糖 DMEM 培养基、Opti-MEM I Medium 和 DMSO 等购自 Invitrogen 公司;细胞培养瓶购自 Corning 公司;其余试剂为国产或进口化学纯或分析纯。Bio-Rad S1000[™] Thermal Cycler PCR 仪和 Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc[™] XRS+ System 化学发光凝胶成像仪均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司;Nikon ECLIPSE TI-U 倒置显微镜购自尼康仪器(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 基于 Tet-On 3G 系统构建 Alb 启动子调控小型猪 uPA 转基因肝细胞特异性表达的慢病毒载体 pLATTPUTG

分三步构建慢病毒载体 pLATTPUTG。第一步,将质粒 pAlb-Cre-GH/BS 作为模板,进行 PCR 扩增 Alb-enhancer/promoter 启动子片段 2346 bp, In-Fusion 克隆至利用 *Xho* I/*Xba* I 双酶切的 pLVX-TetOne 质粒中,以最终获得 Alb 启动子替换 pLVX-TetOne 原有的 PGK 启动子的质粒 pLVX-Alb-TetOne;第二步,以 pCD823 A-1 质粒为模板,PCR 扩增 T2A-CopGFP 序列片段(863 bp),In-Fusion 克隆至利用 *Bam*H I/*Age* I 双酶切的 pLVX-Alb-TetOne 质粒中,获得 pLVX-Alb-TetOne-TRE-T2A-CopGFP (pLATTTG)质粒;第三步,以 H8803 质粒为模板,PCR 扩增 1350 bp 猪的 uPA (puPA) 片段(3'端含 Flag 标签),In-Fusion 克隆至 pLATTTG 质粒中,最终获得慢病毒载体 pLVX-Alb-TetOne-TRE-puPA-T2A-CopGFP (pLATTPUTG)。以上载体 pLVX-Alb-TetOne、pLATTTG 和 pLATTPUTG 均经测序和酶切鉴定。

1.3.2 pLATTPUTG 体外功能验证

借助 Lipofectamine[™] 3000 在六孔板内将质粒

pLATTPUTG 瞬时转染入 293T 细胞,总共转染 6 个孔。24 h 后在倒置荧光显微镜下观察各孔细胞发荧光情况,并拍照;拍照后,选取其中 3 孔加入强力霉素(Doxycycline, Dox)(浓度为 50 ng/mL),48 h 后在倒置荧光显微镜下观察各孔细胞发荧光情况(含未加 Dox 的孔),并拍照;随后收集细胞以提取总 RNA 和总蛋白。总 RNA 提取后,按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书,将其逆转录成 cDNA,再利用 qRT-PCR 检测 puPA 和 CopGFP 在 mRNA 水平的表达;qRT-PCR 用引物:puPA-FP, GTCACCGGCCTGCTTATGAT, puPA-RP, CAAGGCTGGTTCTCGATGGT; CopGFP-FP, CTACCACTTCGGCACCTACC, CopGFP-RP, GTACTTCTCGATCGGGGTGT, GAPDH-FP, ACC CAGAAGACTGTGGATGG, GAPDH-RP, TCTAGACCGCAGGTCAGGTC。提取总蛋白,Western blot 检测 Flag 标签蛋白在 293T 细胞中的表达。

1.4 统计学方法

利用 Gradprim 5.0 软件进行统计分析,数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 以及 $P < 0.001$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体 pLATTPUTG 构建和鉴定

pLATTPUTG 构建分三步完成, pLATTPUTG 的载体结构示意图如图 1A 所示。

2.1.1 构建载体 pLVX-Alb-TetOne

以质粒 pAlb-Cre-GH/BS 作为模板,PCR 扩增 Alb-enhancer/promoter 启动子片段,取 5 μ L 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,条带与理论预测值 2346 bp 相符(结果未显示)。将此 Insert DNA 产物 In-Fusion 克隆至利用 *Xho* I/*Xba* I 双酶切的 pLVX-TetOne 质粒中,获得拟构建的载体 pLVX-Alb-TetOne。对质粒进行测序,结果与预期相符(结果未显示)。

2.1.2 构建载体 pLATTTG

以 pCD823A-1 质粒为模板,PCR 扩增 T2A-CopGFP 片段,取 1 μ L 产物电泳可见一条带,与理论预测值 863 bp 相符(图 1B; Lane 2; Insert DNA)。将此片段 In-Fusion 克隆至利用 *Bam*H I/*Age* I 双酶切的 pLVX-Alb-TetOne 质粒(图 1B; Lane 1; Vector DNA)中,获得所需构建的载体 pLATTTG。pLATTTG 经 *Bam*H I 酶切并电泳可见一条带,其长度与理论预测值相符(图 1B); pLATTTG 经 *Bam*H I

和 *Kpn* I 酶切产生两条片段,其大小与理论预测值相符(图 1B);pLATTTG 经 *Sal* I 酶切产生的两条带,亦与理论预测值一致(图 1B)。同时,对 pLATTTG 质粒进行测序,结果与预期相符(结果未显示)。

2.1.3 载体 pLATTPUTG 构建

以质粒 H8803 为模板,PCR 扩增 puPA+Flag 基因片段,In-Fusion 克隆至利用 *Age* I/*Bam*H I 酶切的 pLATTTG 质粒中,得到的最终载体命名为 pLATTPUTG。次日挑选单菌落,提取质粒并行测序和酶切鉴定。pLATTPUTG 酶切鉴定结果如图 1C 示:PCR 扩增的 puPA+Flag 基因片段电泳可见一条带,与理论预测值 1350 bp 相符(图 1C; Lane 2: Insert DNA);经 *Age* I/*Bam*H I 双酶切后线性化的 pLATTTG 电泳可见一条带,与理论预测值 10965 bp 相符(图 1C; Lane 1: Vector DNA);pLATTPUTG 经 *Kpn* I 酶切电泳可见一条带,其长度与理论预测值相符(图 1C);pLATTPUTG 经 *Xho* I/*Kpn* I 双酶切产生两条片段,其大小与理论预测值 3868 bp 和 8418 bp 相符(图 1C);pLATTPUTG 经 *Sal* I 酶切则可产生两条带,与理论预测值 2185 bp 和 10101 bp 一致(图

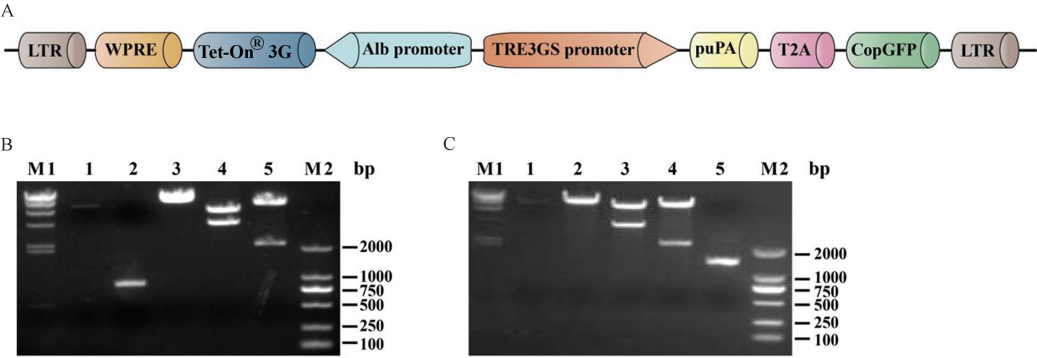
1C)。同时,对质粒 pLATTPUTG 进行测序,结果与预期相符(结果未显示)。以上结果表明慢病毒载体 pLATTPUTG 构建成功。

2.2 pLATTPUTG 瞬时转染 293T 细胞

携带 puPA 和 CopGFP 基因的载体 pLATTPUTG 瞬时转染 293T 细胞,24 h 后倒置荧光显微镜下未见细胞发绿色荧光(图 2A)。六孔板内加入诱导剂 Dox 后 48 h,加 Dox 的孔内几乎所有细胞发强的绿色荧光,而不加 Dox 的孔内仍然未见绿色荧光(图 2B)。以上数据预示,应用该 Tet-On 基因表达调控系统实现了报告基因 CopGFP 在 293T 细胞上的可诱导性表达。

2.3 瞬时转染 pLATTPUTG 的细胞中 puPA、CopGFP 和标签蛋白 Flag 表达

首先,利用 qRT-PCR 检测瞬时转染 pLATTPUTG 的 293T 细胞中 puPA 和 CopGFP 的表达水平;结果显示,与不加 Dox 的孔内细胞相比,加 Dox 的孔内细胞上 puPA 和 CopGFP 表达水平明显升高(图 3A)。Western blot 检测瞬时转染 pLATTPUTG 的 293T 细胞中 Flag 表达;结果显示,不加 Dox 的孔内细胞上仅能检测到极弱的条带,而

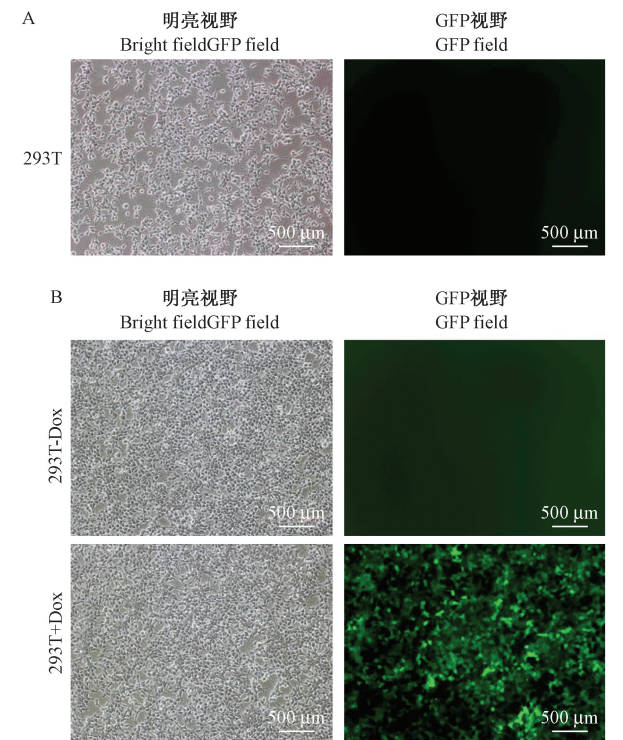


注:A:pLATTPUTG 载体示意图。LTR:长末端重复序列;WPRE:土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件;Alb promoter:白蛋白启动子;TRE3GS promoter:TRE3GS 启动子;puPA/pPLAU:猪尿激酶型纤溶酶原激活剂;T2A:从 *Thosea asigna* 病毒中得到的 2 A 短肽;CopGFP:桃足类绿色荧光蛋白。B:pLATTTG 载体酶切鉴定结果。泳道 M1:λ-*Hind* III digest(TAKARA);泳道 1:Vector DNA;泳道 2:Insert DNA;泳道 3:pLATTTG-BamH I;泳道 4:pLATTTG-BamH I/*Kpn* I;泳道 5:pLATTTG-Sal I;泳道 M2:DL2000 DNA marker。C:pLATTPUTG 载体酶切鉴定结果。泳道 M1:λ-*Hind* III digest(TAKARA);泳道 1:Vector DNA;泳道 2:Insert DNA;泳道 3:pLATTPUTG-Kpn I;泳道 4:pLATTPUTG-Xho I/*Kpn* I;泳道 5:pLATTPUTG-Sal I;泳道 M2:DL2000 DNA marker。

图 1 pLATTPUTG 结构示意图及载体酶切鉴定

Note. A, Schematic illustration of pLATTPUTG. LTR: long terminal repeat; WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Alb promoter: albumin promoter; TRE3GS promoter: TRE3GS promoter; puPA/pPLAU: rat urokinase-type plasminogen activator; T2A: the 2 A peptides from *Thosea asigna* virus (T2A); CopGFP: copepod *Pontellina plumata* green fluorescence protein. B, Enzyme digestion identification of pLATTTG. Lane M1: λ-*Hind*III digest (TAKARA); Lane 1: Vector DNA; Lane 2: Insert DNA; Lane 3: pLATTTG-BamHI; Lane 4: pLATTTG-BamHI/*Kpn*I; Lane 5: pLATTTG-SalI; Lane M2: DL2000 DNA marker. C, Enzyme digestion identification of pLATTPUTG. Lane M1: λ-*Hind*III digest (TAKARA); Lane 1: Vector DNA; Lane 2: Insert DNA; Lane 3: pLATTPUTG-KpnI; Lane 4: pLATTPUTG-XhoI/*Kpn*I; Lane 5: pLATTPUTG-SalI; Lane M2: DL2000 DNA marker.

Figure 1 Schematic illustration of pLATTPUTG and the resulting plasmids identified by enzyme digestion



注:A:倒置荧光显微镜检测瞬转 pLATTPUTG 24 h,不加 Dox 的 293T 细胞上报告基因 CopGFP 表达。B:倒置荧光显微镜检测瞬转 pLATTPUTG 72 h,加入 Dox 的 293T 细胞上报告基因 CopGFP 表达。

图 2 倒置荧光显微镜检测瞬转 pLATTPUTG 的 293T 细胞上报告基因 CopGFP 表达(不加或加 Dox)(× 100)

Note. A, CopGFP assay in 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG for 24 h in the absence of Dox. B, CopGFP assay in 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG for 72 h in the presence of Dox for 48 h.

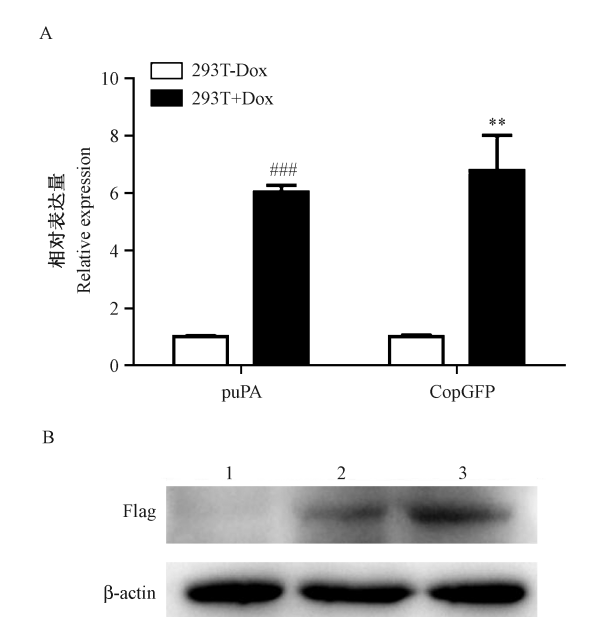
Figure 2 CopGFP assay under an inverted fluorescence microscope in 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG in the absence or presence of Dox

加 Dox 的孔内细胞上则检测到 Flag 极强的表达(图 3B)。

3 讨论

本研究基于 Tet-On 系统成功构建了 Alb 启动子调控猪 uPA 转基因表达的慢病毒载体 pLATTPUTG。我们的体外数据表明,该 Tet-On 基因表达调控系统实现了 puPA、CopGFP 和 Flag 基因在 293T 细胞上可诱导性表达,这些为建立 LATTPUTG 转基因猪打下了良好基础。

如图 1A 所示,我们联合采用该 Tet-On 基因表达调控系统和肝细胞特异性启动子 Alb,以实现 puPA 转基因特异性在猪肝细胞上可诱导性表达,为最终建立药物可控的肝损伤猪模型奠定基础。



注:A:荧光定量 PCR 检测瞬转 pLATTPUTG 48 h,加入和不加入 Dox 的 293T 细胞上 puPA 和 CopGFP 的表达。与不加 Dox 比较,### $P < 0.001$,** $P < 0.01$ 。B:免疫印迹实验检测瞬转 pLATTPUTG 48 h,加入和不加入 Dox 的 293T 细胞上标签蛋白的表达。泳道 1:293T 细胞;泳道 2:293T 细胞瞬转 pLATTPUTG (-Dox);泳道 3:293T 细胞瞬转 pLATTPUTG (+Dox)。

图 3 瞬转 pLATTPUTG 的 293T 细胞中 CopGFP、puPA 和 Flag 表达水平(加 Dox)

Note. A, In the presence of Dox, qRT-PCR was used to test the expressions of puPA and CopGFP in 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG for 48 h. Compared with those without Dox,### $P < 0.001$,** $P < 0.01$. B, In the presence of Dox, western blot was used to determine the expression of Flag transgenes in 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG for 48 h. Lane 1: 293T cells; Lane 2: 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG (-Dox); Lane 3: 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG (+Dox).

Figure 3 The expressions of CopGFP, puPA, and Flag transgenes in 293T cells transiently transfected with pLATTPUTG in the presence of Dox

目前现有的 Fah^{-/-}肝损伤猪模型[延胡索酰乙酰乙酸水解酶(fumarylacetoacetate hydrolase,Fah)基因敲除猪][16-19],有其缺陷性;与其相比,我们基于 Tet-On 系统利用 Dox 诱导的肝损伤模型具有更多优势,首先,Fah^{-/-}猪的肝损伤是不可逆的,且严重依赖于保肝药物 NTBC(2-(2-硝基-4-三氟甲基苯基)-环己烷-1,3-二酮),需要持续服用来维持生命;当在饮食中停止加入 NTBC,猪就会在 7 周左右死亡。另外,NTBC 价格昂贵,使用基于 Fah^{-/-}猪建立的肝损伤动物模型将会产生高昂成本。而建立 LATTPUTG 转基因猪后,只需腹腔注射 Dox,便可诱导肝损伤,操

作简便且建立模型时间较为灵活,同时成本低。此外,载体 pLATTPUTG 引进了报告基因 CopGFP, copGFP 有利于慢病毒生产和病毒滴度测定。

参考文献:

[1] 任晓楠,周晓辉. 用于肝脏疾病研究的人源化小鼠模型概述 [J]. 中国实验动物学报,2014, 22(5): 95-99.

[2] Grompe M. Fah knockout animals as models for therapeutic liver repopulation [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 959:215-230.

[3] Grompe M, Strom S. Mice with human livers [J]. Gastroenterology, 2013, 145(6):1209-1214.

[4] 贾俊双,陈傍柱,林霞,等. 构建 Alb 启动子调控 HBEGF 肝特异性表达的慢病毒载体及其功能验证 [J]. 岭南现代临床外科,2016, 16(3):254-257.

[5] Currier AR, Sabla G, Locaputo S, et al. Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2003,284(3):G508- G515.

[6] Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, et al. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(11):4942-4946.

[7] Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, et al. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene [J]. Cell, 1991, 66(2):245-256.

[8] Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera [J]. Hepatology, 2005, 41(4):847-856.

[9] Ohshita H, Tateno C. Propagation of human hepatocytes in uPA/SCID mice; Producing chimeric mice with humanized liver [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1506:91-100.

[10] Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs [J]. Am J Pathol, 2004, 165(3): 901-912.

[11] Sun Y, Chen X, Xiao D. Tetracycline-inducible expression

systems: new strategies and practices in the transgenic mouse modeling [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007, 39(4):235-246.

[12] Xu K, Deng XY, Yue Y, et al. Generation of the regulatory protein rtTA transgenic mice [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(19):2885-2891.

[13] 张晟,肖高芳,黄黎珍,等. 借助慢病毒将 EGFP 基因导入西藏小型猪胎儿成纤维细胞[J].中国比较医学杂志,2010, 20(4):34-36,55,88.

[14] Postic C, Shiota M, Niswender KD, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase [J]. J Biol Chem, 1999, 274(1):305-315.

[15] Shi JW, Liu W, Zhang TT, et al. The enforced expression of c-Myc in pig fibroblasts triggers mesenchymal-epithelial transition (MET) via F-actin reorganization and RhoA/Rock pathway inactivation [J]. Cell Cycle, 2013, 12(7):1119-1127.

[16] Elgilani F, Mao SA, Glorioso JM, et al. Chronic phenotype characterization of a large-animal model of hereditary tyrosinemia type 1 [J]. Am J Pathol, 2017, 187(1):33-41.

[17] Hickey RD, Lillegard JB, Fisher JE, et al. Efficient production of Fah-null heterozygote pigs by chimeric adeno-associated virus-mediated gene knockout and somatic cell nuclear transfer [J]. Hepatology, 2011, 54(4): 1351-1359.

[18] Hickey RD, Mao SA, Glorioso J, et al. Fumarylacetoacetate hydrolase deficient pigs are a novel large animal model of metabolic liver disease [J]. Stem Cell Res, 2014, 13(1):144-153.

[19] Hickey RD, Mao SA, Glorioso J, et al. Curative ex vivo liver-directed gene therapy in a pig model of hereditary tyrosinemia type 1 [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(349): 349ra99.

[收稿日期]2018-12-17