

王莎莎,朱辉斌,卢晟盛,等. *FAH* 基因敲除克隆小型猪的制备及繁育 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 29-37.
Wang SS, Zhu HB, Lu SS, et al. Generation and breeding of *FAH* gene knockout cloned minipigs [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 29-37.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.005

FAH 基因敲除克隆小型猪的制备及繁育

王莎莎¹, 朱辉斌², 卢晟盛^{1*}, 潘登科^{3*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004;
2. 成都中科奥格生物科技有限公司, 成都 610041;
3. 四川省医学科学院/四川省人民医院 器官移植研究所, 成都 610072)

【摘要】 目的 供体的短缺是器官移植所面临的主要问题, 制备人源化器官是解决此问题的有效途径之一。

缺乏延胡索酸乙酰乙酸水解酶 (fumarylacetoacetate hydrolase, FAH) 会引起遗传性酪氨酸血症 I 型 (hereditary tyrosinemia type I, HT I), 致使患者肝细胞凋亡, 呈现出肝损伤。对猪 (*Sus scrofa*) 进行基因编辑, 建立 *FAH* 基因敲除巴马小型猪, 结合人干细胞将有利于人源化干细胞肝的制备。本研究在 α -1, 3-半乳糖基转移酶基因 (α -1, 3-galactosyltransferase, *GGTA1*) 敲除巴马小型猪的基础上, 通过 CRISPR/Cas9 技术制备 *FAH* 基因敲除 (*FAH*^{+/-}、*FAH*^{-/-}) 小型猪, 并分析其健康与繁育状况。方法 针对猪 *FAH* 基因设计单链导向 RNA (single guide RNA, sgRNA) 构建 pX330 表达载体转染巴马小型猪耳成纤维细胞 (ear fibroblasts of Bama minipigs, BMEF) 并进行敲除效率验证, 鉴定后选择阳性细胞作为核供体, 通过体细胞核移植技术制备 *FAH* 基因敲除巴马小型猪。提取仔猪的基因组 DNA, 经 PCR 测序后得到突变类型; 采集 5 月龄 *FAH*^{+/-} 巴马小型猪血液, 检测其血生化与血常规指标并观察肝组织学染色切片; 当 *FAH*^{+/-} 巴马小型猪公猪性成熟后, 与野生型 (wild type, WT) 母猪配种, 以其产仔数评价繁育能力状况。结果 得到了 *FAH*^{+/-} 巴马小型猪, Western blot 显示 *FAH*^{+/-} 巴马小型猪的肝和肾中 FAH 的表达量均有所下降; *FAH*^{+/-} 猪与野生型相比, *FAH*^{+/-} 猪血液理化指标无显著差异; 组织学切片染色发现 *FAH*^{+/-} 猪肝组织形态出现空泡样变化; 与 *FAH*^{+/-} 公猪配种的野生母猪产仔数正常; *FAH*^{+/-} 猪具有正常的健康状况和繁育能力。结论 本研究制备出了 *FAH* 单基因敲除小型猪, 健康状况及繁育能力正常, 该单基因敲除猪为将来制备出双等位基因敲除猪与人源化肝的研究提供了良好基础。

【关键词】 小型猪; 基因敲除; 延胡索酸乙酰乙酸水解酶 (FAH); CRISPR/Cas9; 繁育; 器官移植; 人源化肝
【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 05-0029-09

Generation and breeding of *FAH* gene knockout cloned minipigs

WANG Shasha¹, ZHU Huibin², LU Shengsheng^{1*}, PAN Dengke^{3*}

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China. 2. Chengdu Clonorgan Biotechnology Co., Ltd, Chengdu 610041. 3. Institute of Organ Transplantation, Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072)

【Abstract】 Objective The shortage of donors is a major problem in organ transplantation, and the generation of humanized organs is an effective method to solve this problem. A lack of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) causes

[作者简介] 王莎莎 (1992—), 女, 硕士研究生, 专业: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: wentzsha@163.com
[通信作者] 潘登科 (1972—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 异种器官移植。E-mail: pandengke2002@163.com
卢晟盛 (1971—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 动物繁殖学。E-mail: sslu@gxu.edu.cn * 共同通信作者

hereditary tyrosinemia type I (HTI), which leads to hepatocyte apoptosis and liver damage. Genetic editing of pigs (*Sus scrofa*), establishment of *FAH* knockout Bama minipigs, combined with human stem cells will facilitate the production of humanized stem cell liver. In this study, *FAH* gene knockout Bama minipigs were generated by CRISPR/Cas9 based on α -1,3-galactosyltransferase (*GGTA1*) gene knockout pigs, and their health and breeding status were analyzed. **Methods**

Single guide RNA (sgRNAs) were designed to target the porcine *FAH* gene to construct a pX330 vector that was transfected into Bama minipig ear fibroblasts. The efficiency of this method was verified. After identification, positive cells were selected as nuclear donors, and *FAH* gene knockout Bama minipigs were generated by somatic cell nuclear transplantation technology. The genomic DNA of piglets was extracted and the mutant type was obtained by PCR sequencing. *FAH*^{+/-} Bama minipig blood was collected at the age of 5 months, and its blood biochemical and blood routine indexes were tested. Histological changes of livers were analyzed. When *FAH*^{+/-} Bama minipigs were sexually mature, they were mated with wild type (WT) sows, and their breeding ability was evaluated by litter size. **Results** *FAH*^{+/-} and *FAH*^{-/-} Bama minipigs were obtained. Western blotting showed that *FAH*^{+/-} Bama minipigs had decreased *FAH* expression in the liver and kidney. There were no significant differences in the physical and chemical indexes of blood from the *FAH*^{+/-} Bama minipigs or WT minipigs. Histological examination revealed vacuolar-like changes in the *FAH*^{+/-} pig liver tissues. The litter size of wild sows bred with *FAH*^{+/-} boars was normal. *FAH*^{+/-} pigs had normal health status and breeding ability. **Conclusions** *FAH* single allele knockout pigs are generated in this study, with normal health and reproductive abilities, which provides a good basis for future studies of the production of double-allele knockout pigs and humanized liver.

[Keywords] minipig; gene knockout; fumarate acetoacetate hydrolase (FAH); CRISPR/Cas9; breeding; organ transplantation; humanized liver

遗传性酪氨酸血症 I 型 (Hereditary tyrosinemia type I, HT I) 是由于延胡索酸乙酰乙酸水解酶 (fumarylacetoacetate hydrolase, FAH) 缺乏而引起的代谢性疾病。1992 年, Kvittingen 等^[1]发现不同临床表型的 FAH 表达量不同, 之后 Bergman 等^[2]发现 *FAH* 基因突变是造成此疾病的主要原因。酪氨酸代谢障碍是由 FAH 减少或缺失所引起, 致使琥珀酰丙酮等有害产物大量积聚对肝和肾造成损害^[3-6]。缓解 HT I 症状最有效的方法是 2-(2-硝基-4-三氟甲基苯甲酰基)-1,3-环己二酮 (2-nitro-4-trifluoro I methylbenzoyl-1,3-cyclohexanedione, NTBC) 配合低酪氨酸饮食^[7], 但是 NTBC 对机体存在副作用, 并且需要通过持续用药来维持治疗效果^[8-10], 目前能够治愈 HT I 的唯一方法是肝移植。作为治疗致命性肝病最为有效的方法^[11], 肝移植的供体通常来源于活体捐赠或者濒死病人, 但其数量有限且不能满足病患需求^[12-13]。1993 年通过对小鼠 *FAH* 基因进行编辑建立了 HT I 小鼠模型^[14], 随后大鼠和兔子模型^[15-16]也被陆续建立, 2017 年美国研究人员成功利用 *FAH* 单基因敲除大白猪, 通过自然繁育获得表型明显的纯合基因敲除个体^[17], 这些动物模型的创建为 *FAH* 基因突变引起的疾病机理、表型及治疗等开展深入的研究提供了基础。

FAH 基因的敲除可对机体产生持续且不可逆的肝损伤, 阻碍肝细胞的增殖, 诱发自身肝细胞凋

亡, 提供了适宜外源性干细胞再生的“空位”, 可利用人类干细胞进行增值修复。随着异种嵌合研究的不断深入使得制备人源化肝得以实现, 为异种嵌合和异种移植研究提供可行性材料。因此制备 *FAH* 基因敲除巴马小型猪, 为寻求利用基因缺陷猪制备人源化肝进行替代治疗策略提供了一条新思路。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术敲除巴马小型猪 *FAH* 基因, 并对其生理状况和繁育能力进行评估, 获得了健康的单等位基因敲除猪, 为后续通过自然繁育得到双等位基因敲除巴马小型猪与制备人源化肝奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

普通级野生型巴马小型猪雌性 4 头 (6~8 月龄, 体重 16~20 kg)、雄性 4 头 (6~8 月龄, 体重 16~20 kg)、受体母猪 8 头 (6~8 月龄, 体重 150~200 kg), 均饲养于四川省邛崃养殖场 [SCXK(川)2019-032] [SYXK(川)2019-221]。实验动物饲养和实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀, 本研究的福利伦理审批号为 2018002。

1.1.2 细胞系

GGTA1 基因敲除 (α -1, 3-galactosyltransferase knockout, GTKO) 巴马小型猪耳成纤维细胞系保存于本实验室。

1.1.3 质粒

pX330 质粒由中国农业大学胡溢清博士惠赠;pCMV-C-EGFP 质粒购自碧云天生物技术有限公司(上海)。

1.2 主要试剂与仪器

Premix LA Taq DNA 聚合酶 (Takara Biotechnology, 大连); DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒 (Zymo Research, USA); 限制性内切酶 *Bbs* I (New England Biolabs, USA); 总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 北京); 电转染试剂盒 (Lonza, Germany); DMEM-High Glucose (Gibco, USA; 细胞培养相关耗材 (Corning, USA); 胚胎培养相关耗材 (Thermo Scientific, USA); 兔源 FAH 一抗 (Sigma-Aldrich, USA); 羊抗兔二抗-HRP (艾博抗贸易有限公司, 上海); 其他化学试剂参照已发表文章^[18-19]。电泳槽 (六一仪器厂, 北京); 流式细胞仪 (Becton Dickinson FACSscan, 法国); CO₂ 培养箱 (Nuair, 美国); 卵母细胞融合仪 (CF150/B, BLS, 匈牙利); 显微操作系统 (TransferManNK2, Eppendorf, 德国) 一次性细胞培养皿 (35 mm、60 mm, Griner, 德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 打靶载体构建

根据查找所得猪 *FAH* 基因序列信息 (Gene ID: 100623036), 运用 Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>) 在其第二外显子 (Exon2) 构建 6 个靶向 sgRNA。将合成的 sgRNA 二聚化后与通过 *Bbs* I 酶切回收的 pX330 表达载体连接, 连接后送测序, 测序结果适宜的质粒进行转化、扩繁、提取, -20℃ 保存。

1.3.2 转染

巴马小型猪耳成纤维细胞, 用含有 20% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的杜氏改良培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 培养, 至细胞生长汇合度到 80% 及以上时, 用 0.1% 胰蛋白酶消化并收集 1×10⁶ 细胞, 取 4 μg pX330 质粒与 1 μg 绿色荧光蛋白 (pCMV-C-EGFP) 质粒加入电转液重悬细胞, Lonza 核转染仪进行电转染, 将转染后的细胞移入 60 mm 细胞培养皿培养。

1.3.3 sgRNA 敲除效率检测

在 sgRNA 靶点两侧设计引物 (表 1), 转染 72 h 后对混合细胞提取 DNA, 稀释至 50 ng/μL, -20℃ 保存, 扩增目的片段, PCR 反应体系如表 2, PCR 反应条件为: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃

25 s) × 32 个循环; 72℃ 8 min; 16℃ ∞, 产物跑胶纯化回收目的片段, TA 克隆, 涂于含 AMP⁺ 的 LB 固体琼脂糖平板, 挑取 40 个菌落测序, 计算 sgRNA 敲除效率, 挑选敲除效率最高的 sgRNA 靶点质粒进行后续实验。

表 1 寡核苷酸序列
Table 1 Oligonucleotide sequences

靶点 Target	碱基序列 (5'→3') Base sequences (5'→3')	碱基数 (bp) Base number
FAH-g1	CCAATCGCCACGCCAGTCCT	20
FAH-g2	AGAGGTGCTTTATGACACTG	20
FAH-g3	CTTAACAGCTTCATGGGCCT	20
FAH-g4	GAACATGACTCCGACATTTG	20
FAH-g5	CAAACGTCGGAGTCATGTTT	20
FAH-g6	GACGTTTGTGGCGTGCTGCC	20

表 2 PCR 扩增反应体系
Table 2 PCR amplification reaction system

组分 Components	体积 (μL) Volume
模板 Template	2
2× Taq DNA polymerase mix	25
Primer-F	2
Primer-R	2
ddH ₂ O	19
合计 Total	50

1.3.4 单细胞克隆的获得及鉴定

pX330 质粒与 pCMV-C-EGFP 质粒如 1.3.2 共转染 *GGTA1* 基因敲除巴马小型猪耳成纤维细胞, 48 h 后通过流式细胞仪富集带绿色荧光的细胞, 将富集的细胞有限稀释接种到 10 cm 细胞培养皿中培养, 每隔 48 h 更换一次培养基, 直至单细胞克隆出现。显微镜下挑选状态良好的单细胞克隆, 经 DPBS 洗涤后用胰蛋白酶消化后移入 48 孔细胞培养皿培养, 待生长汇合至 80% 以上, 取部分细胞进行 *FAH* 基因突变类型鉴定, 鉴定引物信息及 PCR 扩增反应体系见 1.3.3, 挑选阳性且状态良好的单细胞克隆用于体细胞核移植。

1.3.5 FAH 基因敲除克隆猪的制备及鉴定

1.3.4 中所得 *FAH* 阳性单细胞克隆作为核供体, 胞质受体选择去核的体外成熟卵母细胞。盲吸法去除卵母细胞的细胞核与第一极体, 用电融合法激活重构胚^[20]。分别将双等位基因敲除细胞克隆 (*FAH*^{-/-}) 胚胎与单等位基因敲除细胞克隆 (*FAH*^{+/-}) 胚胎, 移植到受体母猪中, 胚胎移植方法及培养条件参照潘登科等^[21]。其中 *FAH*^{-/-} 胚胎移植组 2 头受体母猪为了缓解 HT I 的临床症状, 移植后每天每头饲喂 50~100 mg NTBC, 第 28 天 B 超

检测受体猪的妊娠情况,之后每月进行一次 B 超检测,妊娠至 117 d 左右产仔。待仔猪出生后,采集耳组织样本并提取基因组 DNA,经 PCR 扩增目的片段、TA 克隆及测序来确定仔猪 *FAH* 基因突变类型,鉴定引物信息及 PCR 扩增反应体系见 1.3.3。

1.3.6 仔猪血常规及血生化检测

5 月龄 *FAH*^{+/−} 仔猪 5 头、同月龄野生型仔猪 4 头,禁食 16 h 采血,抽血当日在其清醒状态下从前腔静脉采集血液 7 mL,取 2 mL 注入抗凝采血管中,轻轻摇动混合均匀避免凝血,进行血常规检测;剩余 5 mL 注入促凝管中,3000 r/min 离心 10 min,取血清进行血生化检测。

1.3.7 组织学切片观察

采集 *FAH*^{+/−} 猪及野生型对照猪的同月龄的肝组织约 1 cm³ 的块状体,将其完全浸泡于 4% 的多聚甲醛中固定,之后将其进行脱水、石蜡包埋、冷冻放置、切片及脱蜡。制备好的石蜡切片进行苏木精-伊红染色处理,染色后清洗并用中性树胶固定,显微镜下观察并采集图像。

1.3.8 Western blot 检测

分别取一头 5 月龄 *FAH*^{+/−} 仔猪与野生仔猪肝和肾组织样本研磨成细粉状,加入 800 μL RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,收集裂解液,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度,添加上样缓冲液,100℃ 水浴 8 min 变性蛋白。取 12% SDS-PAGE 分离蛋白,转 PVDF 膜,封闭,选用 GAPDH 作为内参,一抗 4℃ 过夜孵育,二抗 37℃ 孵育 2 h,ECL 发光法显色曝光。

1.3.9 *FAH*^{+/−} 猪繁育能力及统计学分析

F₀ 代 *FAH*^{+/−} 公猪在生长到 6 月龄时性成熟,用野生型母猪与其配种,记录下母猪的妊娠数、每窝产仔猪数以及存活的仔猪数,与相同月龄的相同时期相同品种的初产野生母猪繁育状况进行比对。待 F₁ 代 *FAH*^{+/−} 猪性成熟后,用 *FAH*^{+/−} 公猪与

FAH^{+/−} 母猪交配,记录 F₁ 代母猪妊娠数及窝产仔猪数。

1.4 统计学方法

SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。所得数据以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均值比较采用单因素方差分析 (ONE-WAY ANOVA) 方法,组间两两比较选用 LSD-*t* 检验法,*P* < 0.05 表示差异显著,*P* < 0.01 表示差异极显著。

2 结果

2.1 打靶载体构建及效率检测

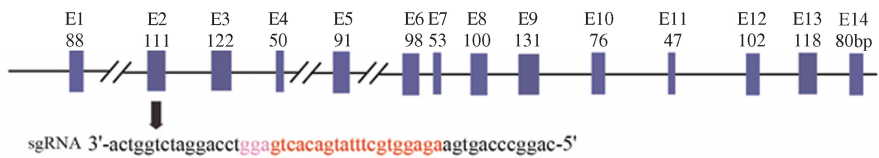
在巴马小型猪 *FAH* 基因的 Exon2 上设计构建了 6 个不同的 sgRNA 打靶载体,与 pX330 质粒连接构建表达载体并进行效率验证 (*FAH*-g1 ~ *FAH*-g6)。其中 *FAH*-g2 的突变效率为 28% (11/40) (图 1),为有效载体。

2.2 单细胞克隆突变类型的鉴定

转染后,流式富集带荧光细胞,取部分细胞经 DNA 测序,*FAH* 基因突变效率为 81.8%。鉴定 22 个单细胞克隆,获得 *FAH*^{−/−} 单细胞克隆 16 个,其中纯合型 13 个、杂合型 3 个;*FAH*^{+/−} 单细胞克隆 2 个、野生型 4 个 (表 3)。

2.3 *FAH* 基因敲除猪的制备与鉴定

状态良好的 *FAH*^{−/−} 与 *FAH*^{+/−} 单克隆细胞被用于体细胞核移植。*FAH*^{−/−} 重构胚胎 1191 枚,*FAH*^{+/−} 重构胚胎 346 枚,共 1537 枚移植 6 头受体母猪。2 头受体母猪移植 *FAH*^{+/−} 重构胚胎,1 头妊娠至终期,5 头仔猪出生 (表 4,图 2),PCR 测序鉴定 5 头仔猪均为同一类型 (+1 bp) 的 *FAH* 单等位基因敲除猪 (图 3);*FAH*^{−/−} 重构胚胎移植组,4 头受体母猪 (表 4),饲喂 NTBC 组中一头妊娠至终期,出生 4 头猪仔,1 头于出生后 4 天死亡,2 头出生后 5 天死亡,1 头出生后 6 天死亡,经 PCR 测序鉴定 4 头均为 *FAH* 双等位基因敲除猪。



注:下划线:sgRNA 识别靶序列;粉色字母:原间隔序列临近基序 (PAM);E1~E14;外显子 1~外显子 14。

图 1 *FAH* 基因 sgRNA 靶位点

Note. Underlined text: sgRNA recognizes a target sequence. Pink letter: protospacer adjacent motif (PAM). E1-E14; exon 1-exon 14.

Figure 1 Target site of the *FAH* gene sgRNA

表 3 单细胞克隆敲除类型
Table 3 Monoclonal knockout type

	突变类型 Mutation type	单细胞克隆 Monoclonal
<i>FAH</i> ^{+/−}	WT/+1 bp	A8
	WT/+1 bp	B18
<i>FAH</i> ^{−/−} (杂合型) <i>FAH</i> ^{−/−} (Heterozygous)	−2 bp/+1 bp	A10
	−5 bp/+1 bp	A28
	−11 bp/+1 bp	B20
<i>FAH</i> ^{−/−} (纯合型) <i>FAH</i> ^{−/−} (Homozygous)	−4 bp	A4、A16
	+1 bp	A1、A3、A7、A13、A19、 A35、A38、B4、B14、B19、B27

表 4 *FAH* 基因突变细胞体细胞核移植结果
Table 4 Results of somatic cell nucleus transplantation in the *FAH* genetically modified cells

受体母猪 Recipient	移植胚胎数 Transferred embryos		妊娠 Pregnancy	产仔头数 Litter size	饲喂 NTBC Feeding NTBC	存活仔猪头数 Number of survival piglets
	<i>FAH</i> ^{+/−} 胚胎 <i>FAH</i> ^{+/−} embryos	<i>FAH</i> ^{−/−} 胚胎 <i>FAH</i> ^{−/−} embryos				
6-21	115	124	+	5	/	5
6-22	231	124	−	/	/	/
6-29	/	156	−	/	/	/
6-30	/	75	−	/	/	/
8-4	/	365	−	/	50~100 mg/d	/
8-6	/	347	+	4	50~100 mg/d	/
合计 Total	346	1191	2	9		5

注：+：妊娠；−：未妊娠；/：无。
Note. +: Pregnancy; −: Not pregnancy; /: Not detected.



图 2 *FAH* 单等位基因敲除仔猪
Figure 2 *FAH* single allele knockout piglets

2.4 仔猪血液检测

血常规检测显示,*FAH*^{+/−}猪与野生型猪在淋巴细胞数检测结果上存在显著差异($P<0.05$,表5),但*FAH*^{+/−}猪与野生型猪的检测数值均在参考文献的正常数值范围内^[22],表明*FAH*单等位基因敲除

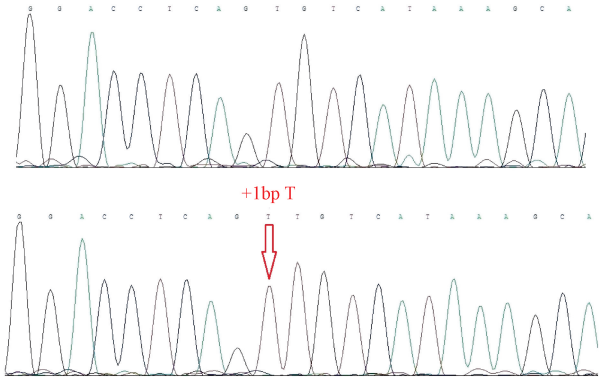


图 3 *FAH* 单等位基因敲除仔猪测序结果
Figure 3 Sequencing results of the *FAH* single allele knockout piglets

猪的生理健康正常(表5)。血液生化指标检测显示,*FAH*^{+/−}猪与野生型猪的尿素氮含量差异极显著($P<0.01$,表6)。HT I 病人血液中的酪氨酸、苯丙氨酸等氨基酸的含量较正常对照组增高,因此对*FAH*^{+/−}巴马小型猪和野生型巴马小型猪进行血液氨基酸检测(表6),检测结果显示*FAH*^{+/−}组与野生对照组在酪氨酸、苯丙氨酸等氨基酸的变化上无显著差异($P>0.05$)。

表 5 *FAH*^{+/-} 仔猪血常规检测
Table 5 Routine blood examination of the *FAH*^{+/-} piglets

血液生理指标 Blood routine indexes	<i>FAH</i> ^{+/-} (<i>n</i> = 5)	野生型 (<i>n</i> = 4) Wild type
白细胞数 (10 ⁹ /L) White blood cells (WBC)	25. 68±0. 99	32. 35±3. 04
红细胞数 (10 ¹² /L) Red blood cells (RBC)	8. 29±0. 31	7. 40±0. 32
血红蛋白 (g/L) Hemoglobin (HGB)	162. 20±7. 24	141. 25±6. 08
红细胞压积 (%) Red blood cell specific volume (HCT)	47. 90±2. 20	41. 98±1. 77
红细胞平均容积 (fL) Erythrocyte mean corpuscular volume (MCV)	57. 70±0. 55	56. 73±0. 41
红细胞平均血红蛋白 (pg) Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	19. 54±0. 23	19. 10±0. 24
红细胞平均血红蛋白浓度 (g/L) MCHC)/	338. 80±3. 47	336. 25±1. 71
红细胞分布宽度变异系数 (%)	17. 46±0. 25	17. 53±0. 17
Red cell volume distribution width coefficient of variation (RDV-CV)		
血小板数 (10 ⁹ /L) Platelets (PLT)/	1348. 20±84. 61	1397. 50±155. 32
血小板压积 (%) Plateleterit (PCT)	1. 10±0. 07	1. 14±0. 13
血小板平均容积 (fL) Mean platelet volume (MPV)	8. 16±0. 06	8. 10±0. 00
淋巴细胞数 (10 ⁹ /L) Lymphocyte count (LYM#)	14. 02±0. 42 *	19. 90±1. 60
中间细胞数 (10 ⁹ /L) Intermediate cell count (MID)	3. 88±0. 39	4. 32±0. 49
中性粒细胞数 (10 ⁹ /L) Neutrophil count (GRA#)	7. 74±0. 75	8. 10±1. 47
淋巴细胞百分比 (%) Lymphocytes percentage (LYM%)	55. 04±2. 24	61. 98±3. 03
中间细胞百分比 (%) Intermediate cell percentage (MID%)	14. 90±0. 86	13. 45±0. 78
中性粒细胞百分比 (%) Neutrophilic granulocyte percentage (GRA%)	30. 00±2. 18	24. 55±2. 38

注:与野生型相比, * *P*<0. 05, ***P*<0. 01。表 6 同。
Note. Compared with the wild type, * *P*< 0. 05, ***P*< 0. 01. The same in the figure 6.

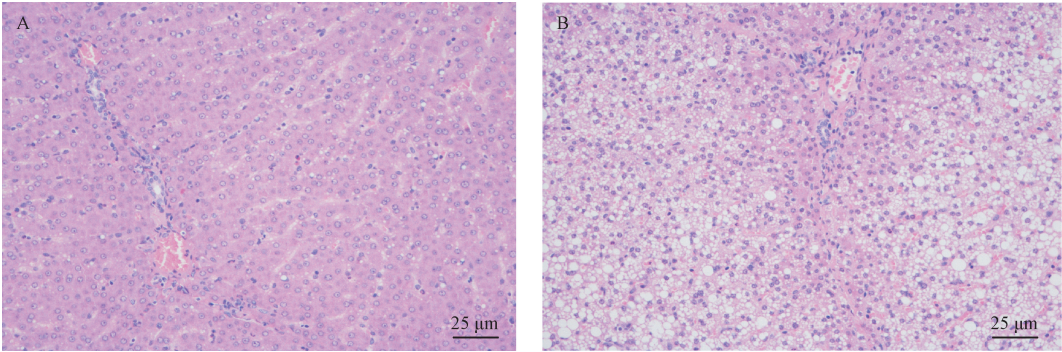
表 6 *FAH*^{+/-} 仔猪血生化指标检测
Table 6 Blood biochemical parameters of the *FAH*^{+/-} piglets

血生化指标 Blood biochemical indexes	<i>FAH</i> ^{+/-} (<i>n</i> = 5)	野生型 (<i>n</i> = 4) Wild type
丙氨酸氨基转移酶 (U/L) Alanine aminotransferase (ALT)	45. 00±5. 13	49. 00±6. 12
天冬氨酸氨基转移酶 (U/L) Aspartate aminotransferase (AST)	37. 00±5. 57	46. 67±8. 82
总蛋白 (g/L) Total protein (TP)	66. 67±3. 48	63. 50±1. 71
白蛋白 (g/L) Albumin (ALB)	39. 33±0. 33	40. 50±2. 25
球蛋白 (g/L) Globulin (GLB)	27. 33±3. 53	23. 00±3. 03
白蛋白/球蛋白 ALB/GLB (A/G)	1. 49±0. 18	1. 88±0. 34
总胆红素 (μmol/L) Total bilirubin (TBIL)	1. 50±0. 12	2. 30±0. 44
直接胆红素 (μmol/L) Direct bilirubin (DBIL)	1. 30±0. 15	1. 60±0. 30
间接胆红素 (μmol/L) Indirect bilirubin (IBIL)	0. 20±0. 06	0. 50±0. 10
γ-谷酰转肽酶 (U/L) γ-Glutamyl transpeptidase (GGT)	118. 33±2. 60	109. 00±6. 70
乳酸脱氢酶 (U/L) Lactate dehydrogenase (LDH)	400. 67±55. 81	445. 00±45. 11
淀粉酶 (U/L) Amylase (AMY)	1662. 00±104. 31	1997. 25±164. 42
葡萄糖 (mmol/L) Glucose (GLU)	5. 94±0. 79	5. 57±0. 76
尿素氮 (mmol/L) Urea nitrogen (BUN)	1. 67±0. 09 **	4. 45±0. 29
肌酐 (μmol/L) Creatinine (Cre)	43. 00±4. 36	43. 00±3. 49
胆固醇 (mmol/L) Cholesterol (CHOL)	1. 68±0. 17	2. 08±0. 23
甘油三酯 (mmol/L) Triglyceride (TRIG)	0. 20±0. 08	0. 47±0. 17
K ⁺ (mmol/L)	6. 43±0. 67	7. 43±0. 42
P ⁺ (mmol/L)	2. 56±0. 15	2. 77±0. 11
酪氨酸 (μmol/L) Tyrosine	49. 03±7. 15	42. 43±1. 13
苯丙氨酸 (μmol/L) Phenylalanine	87. 10±10. 07	92. 56±3. 77
脯氨酸 (μmol/L) Proline	114. 14±11. 42	105. 24±2. 45
苏氨酸 (μmol/L) Threonine	43. 31±4. 40	51. 97±3. 70

2. 5 组织学切片观察

对所制得 *FAH*^{+/-} 巴马小型猪及野生型猪肝的组织学切片进行 HE 染色后发现 (图 4):细胞核都

被染成深蓝色,其余组织部分被染成深浅各不相同的粉色,对比观察,右侧图片即 *FAH*^{+/-} 肝 HE 染色发现出现较明显的空泡样变化,说明 *FAH* 基因单等位



注：A：WT 猪的肝组织；B：*FAH*^{+/-}猪的肝组织。

图 4 肝组织学形态变化(HE 染色,× 400)

Note. A: Liver tissue of WT pig. B: Liver tissue of *FAH*^{+/-} pig.

Figure 4 Histology of the liver tissues. HE staining

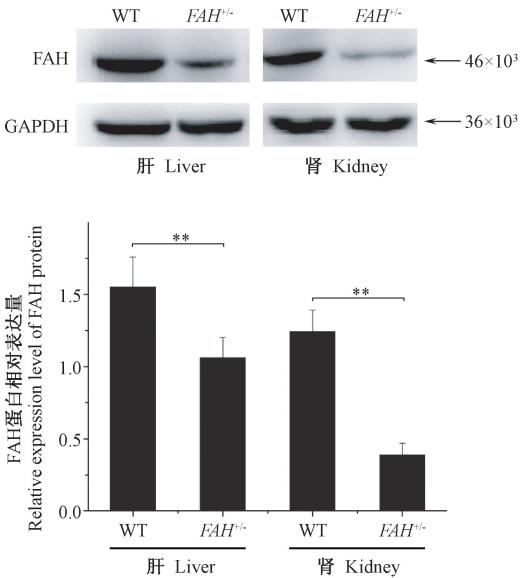
敲除会影响机体肝发育并出现较明显的病变但并不会影响机体的正常的生长状况。

2.6 Western blot 检测

结果显示:在样品上样量相同的情况下,*FAH*^{+/-}巴马小型猪肝和肾中 FAH 的表达量与野生型巴马小型猪相比均显著降低;经 Image J 1. 8. 0 对灰度值进行分析可得:*FAH*^{+/-}巴马小型猪肝和肾中 FAH 的表达量与野生型巴马小型猪相比,差异极显著($P < 0. 01$),表明 *FAH* 单等位基因敲除影响了 FAH 蛋白的表达(图 5)。

2.7 *FAH*^{+/-}猪繁育能力分析

F₀ 代 *FAH*^{+/-}猪配种后产下 3 窝仔猪,经统计每窝平均产仔数为(9. 00±1. 41)头,每窝平均仔猪存活数为(8. 33±0. 94)头(表 7)。断奶时,所有仔猪均健康存活,其中 9 头为 *FAH*^{+/-}猪,其余为野生型猪。待 F₁ 代 *FAH*^{+/-}猪性成熟后,根据存活及健康状况,用 F₀ 代 *FAH*^{+/-}公猪与 F₁ 代 *FAH*^{+/-}母猪交配,产下一窝仔猪,由于产房温度较低,产下的 10 头仔猪只存活 1 头,经测序鉴定 F₂ 代仔猪中 *FAH* 单等位基因敲除 6 头,双等位基因敲除 3 头,野生型 2 头,存活仔猪编号为 FAH-162,基因型鉴定结果为 *FAH* 单等位基因敲除(图 6)。



注:WT: 野生型; GAPDH: 内参; 与野生型相比, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ 。

图 5 Western blot 检测 FAH 蛋白表达量

Note. WT means wild type. GAPDH serves as an internal control. Compared with the wild type, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$.

Figure 5 FAH protein expression levels detected by Western blot

表 7 F₀ 代 *FAH*^{+/-}猪窝产仔数及存活数

Table 7 Litter size and survival number of the F₀ *FAH*^{+/-}Pigs

编号 No.	窝产仔数 Litter size		每窝存活仔数 Number of surviving piglets	
	<i>FAH</i> ^{+/-}	WT	<i>FAH</i> ^{+/-}	WT
1	10	8	9	7
2	7	9	7	9
3	10	11	9	10
合计 Total	9. 00±1. 41	9. 33±1. 25	8. 33±0. 94	8. 67±1. 25

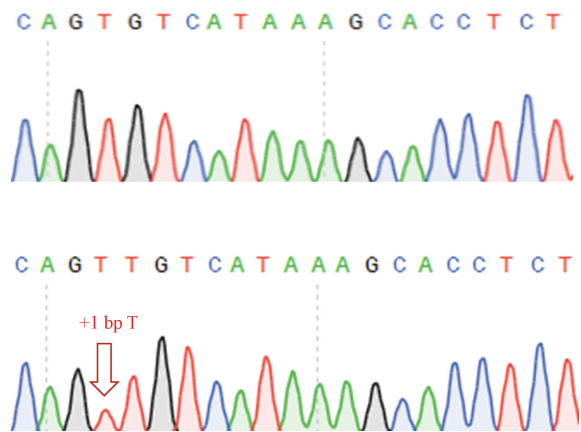


图 6 FAH-162 FAH 基因敲除仔猪测序结果
Figure 6 Sequencing results of the FAH-162FAH knockout piglets

3 讨论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对 *GGTA1* 基因敲除巴马小型猪^[23]的体细胞进行编辑,创建了 *FAH* 单等位基因敲除小型猪,利用 *FAH*^{+/−}猪通过自然繁育将得到 *FAH*^{−/−}猪,此基因敲除猪会出现肝损伤,形成肝“空位”,有利于人类干细胞的再生^[24],由于利用猪制备人源化肝会携带部分猪自体细胞,造成超急性免疫排斥反应(hyperacute rejection, HAR),而敲除猪的 *GGTA1* 基因能解决 HAR^[25–29],因此在该基因敲除小型猪体细胞进行基因编辑,将有利于对人源化肝及异种移植的深入研究^[28],为相关异种嵌合和异种移植提供了可行性分析。

多年来大家一直对基因敲除动物的健康状况密切关注,众多的研究表明克隆对动物自体的影响微乎其微^[27,31–33]。本研究对比分析了基因敲除巴马小型猪与野生型间血常规与血生化检测结果, *FAH* 基因敲除后实验组猪尿素氮的水平明显下降,可能是由于 *FAH* 基因突变会造成 HT I,模型猪中该基因的缺失导致 *FAH* 的表达量有所下降,从而潜在影响了蛋白代谢和肾功能;HE 染色观察到 *FAH* 基因单等位基因敲除会对机体肝细胞及组织形态造成一定影响,但不会对其健康状况造成危害。 *FAH*^{+/−}猪与野生型猪的淋巴细胞数存在显著差异 ($P<0.05$),但 *FAH*^{+/−}猪与野生型猪的检测数值均在参考文献的正常数值范围内,表明获得的 *FAH* 基因敲除猪健康状况良好,可正常进行养殖,为后续的实验创造良好的实验基础。

巴马小型猪初产约 8.5 头每窝,经产约 10 头每窝^[22]。利用 *FAH*^{+/−}巴马公猪与同种野生型母猪交

配,窝产仔平均数为 (9.0 ± 1.41) 头。从以上数据来看,本研究得到的 *FAH*^{+/−}猪的繁殖能力正常,并且利用 *FAH*^{+/−}巴马公猪与 *FAH*^{+/−}巴马母猪配种,通过 NTBC 纠正 *FAH*^{−/−}胎儿在子宫中的致命发育缺陷,维持正常发育, *FAH*^{+/−}猪已繁育到 F_2 代,表明得到的基因编辑克隆猪的繁殖能力并未受到影响。 *FAH*^{+/−}猪的创建为通过自然繁育制备 *FAH*^{−/−}猪提供了基础,为进一步利用基因敲除猪与人干细胞制作嵌合人源化肝奠定了良好的实验材料基础。

本研究表明, *FAH* 单等位基因敲除不会对个体造成异常的不良健康状况,但会造成肝和肾中 *FAH* 的表达量降低,表明对该基因敲除猪肝和肾微环境的变化存在着潜在的影响。在 *FAH*^{+/−}猪自然繁育的过程中发现双等位基因敲除猪出生后很难存活,可能是由于为防止其发育缺陷而饲喂的 NTBC 的副作用致使仔猪存活受阻,此现象为以后 *FAH*^{−/−}的饲喂繁育提供了研究数据。本研究得到的 *FAH*^{+/−}猪的繁育能力正常,血生理生化指标也在正常数据范围内, *FAH*^{+/−}小型猪的成功制备,为后续推动 *FAH*^{−/−}猪的建立和繁育以及利用基因敲除猪通过与人干细胞进行嵌合体制作,制备出人源化肝的研究,提供了优良的实验材料与研究基础。

参考文献:

[1] Kvittingen EA, Rootwelt H, Van DT, et al. Hereditary tyrosinemia type I : lack of correlation between clinical findings and amount of immunoreactive fumarylacetoacetase protein[J]. *Pediatr Res*, 1992, 31(1) : 43–46.

[2] Jorquera R, Tanguay RM. The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(1) : 42–48.

[3] Orejuela D, Jorquera R, Bergeron A, et al. Hepatic stress in hereditary tyrosinemia type I (HT I) activates the AKT survival pathway in the *fah*^{−/−} knockout mice model [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(2) : 308–317.

[4] Qi Z, Wang X, Wei H, et al. Infiltrating neutrophils aggravate metabolic liver failure in *fah* deficient mice [J]. *Liver Int*, 2015, 35(3) : 774–785.

[5] Lindblad B, Lindstedt S, Steen G. On the enzymic defect in hereditary tyrosinemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74 (10) : 4641–4645.

[6] Hancock ML, Meyer RC, Mistry M, et al. Insulin receptor associates with promoters genome-wide and regulates gene expression [J]. *Cell*, 2019, 177(3) : 722–736.e22.

[7] Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, Rolland MO, et al. NTBC treatment in tyrosinaemia type I : long-term outcome in French

- patients [J]. J Inherit Metab Dis, 2008, 31(1): 81-87.
- [8] Ellis MK, Whitfield AC, Gowans LA, et al. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 133(1): 12-19
- [9] Holme E, Lindstedt S. Tyrosinaemia type I and NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) [J]. J Inherit Metab Dis, 1998, 21(5): 507-517.
- [10] Molchanov S, Gryffkeller A. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione [J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(3): 447-454.
- [11] 陈钟, 陈瑞新, 丁义涛, 等. 新型生物人工肝系统治疗急性肝衰竭犬后猪内源性逆转录病毒传播的实验研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2007, 27(3): 175-177.
- [12] 吴爽, 魏凤香, 李红枝, 等. 柠檬百里香叶挥发油成分分析及对肝癌细胞毒性作用 [J]. 中药材, 2013, 36(5): 756-759.
- [13] 吴贻琛, 万志红, 辛绍杰. 干细胞移植治疗肝功能衰竭的研究进展及应用前景 [J]. 肝脏, 2015, 20(3): 251-254.
- [14] Mitchell G, Bartlett DW, Fraser TE, et al. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize [J]. Pest Manag Sci, 2001, 57(2):120-128.
- [15] 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.
- [16] Li L, Zhang Q, Yang H, et al. Fumarylacetoacetate hydrolase knock-out rabbit model for hereditary tyrosinemia type I [J]. J Biol Chem, 2017, 292(11): 4755-4763.
- [17] Elgilani F, Mao SA, Glorioso JM, et al. Chronic phenotype characterization of a large animal model of hereditary tyrosinemia type I [J]. Am J Pathol, 2017,187(1): 33-41.
- [18] 黄林华, 李西睿, 龙川, 等. CRISPR/Cas9 介导 CMAH 基因敲除猪创制及繁育分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 1064-1073.
- [19] 唐雨婷, 高景波, 龙川, 等. CRISPR/Cas9 介导的 $\beta 4GalNT2$ 基因敲除猪制备 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(10): 1697-1705.
- [20] Isalan M, Klug A, Choo Y. Comprehensive DNA recognition through concerted interactions from adjacent zinc fingers [J]. Biochemistry, 1998, 37(35): 12026-12033.
- [21] Pan DK, Zhang L, Zhou YR, et al. Somatic cell nuclear transfer production transfected omega-3 fatty acids to the saturated enzyme gene sFat-1 cloned pig [J]. Science in China (Series C: Life Sciences), 2009, 3: 295-302.
- [22] 冯书堂. 中国实验用小型猪 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [23] Feng C, Li XR, Cui HT, et al. Highly efficient generation of GGTA1 knockout pigs using a combination of TALEN mRNA and magnetic beads with somatic cell nuclear transfer [J]. J Integr Agric, 2016,15(7): 1540-1549.
- [24] Niemann H. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning[J]. Theriogenology, 2016, 86(1): 80-90.
- [25] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. Science, 2002, 295(5557): 1089-1092.
- [26] Dai Y, Vaught T D, Boone J, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(3): 251-256.
- [27] Wu J, Plateroluengo A, Sakurai M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells [J]. Cell, 2017, 168(3): 473-486.
- [28] 郑道山, 冯冲, 朱彦宾, 等.利用启动子缺陷型打靶载体敲除五指山小型猪 *GGTA1* 基因[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 458-462.
- [29] Xin J, Yang H, Fan N, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84250.
- [30] Liu HB, Lv PR, He RG, et al. Cloned Guangxi Bama minipig (*Sus scrofa*) and its offspring have normal reproductive performance [J]. Cell Reprogram, 2010, 12(5): 543-550.
- [31] 刘芳遐.人肝源性干细胞在 $Fah^{-/-}Rag2^{-/-}$ 小鼠中生物学行为的研究[D]. 第二军医大学, 2010.
- [32] Paulk NK, Wursthorn K, Wang Z, et al. Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia *in vivo* [J]. Hepatology, 2010, 51(4):1200-1208.
- [33] Sinclair KD, Corr SA, Gutierrez CG, et al. Healthy ageing of cloned sheep [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12359.

[收稿日期]2019-03-14