

李杰, 闫振宇. 血友病鼠模型的构建及研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 141 - 146.
Li J, Yan ZY. Construction and research progress of hemophilia mouse models [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 141 - 146.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.023

血友病鼠模型的构建及研究进展

李杰¹, 闫振宇^{1,2*}

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

【摘要】 血友病是一种单基因遗传性疾病, 主要发病机制为编码凝血因子的基因突变所导致凝血因子减少。临床表现为反复出血, 严重时可危及生命, 尚不能治愈。目前正在研究的基因治疗则具有治愈血友病的可能。在基因治疗的研究中, 动物模型是必不可少的基础支持条件。血友病鼠模型因其自身特点, 如便于运输, 研究费用少于其它大型动物等, 在众多动物模型中脱颖而出, 成为血友病动物模型研究的热点。血友病鼠模型的构建经过 20 多年的历程, 逐渐成熟。极大地促进了血友病基因治疗的发展, 现就血友病鼠的构建及研究进展予以综述。

【关键词】 血友病; 动物模型; 小鼠; 基因治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0141-06

Construction and research progress of hemophilia mouse models

LI Jie¹, YAN Zhenyu^{1,2*}

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China.
2. The Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

【Abstract】 Hemophilia is a monogenic hereditary disease whose pathogenesis includes the reduction of coagulation factors caused by mutations in genes encoding coagulation factors. The clinical manifestation of this disease is recurrent bleeding, which can be life-threatening in severe cases and cannot be cured. Currently, gene therapy might have the potential to cure hemophilia. In gene therapy research, animal models are commonly used. The mouse hemophilia model is useful because of its convenience for transportation and lower research costs when compared with other large animal models. It has become a hot spot for research using animal hemophilia models. After more than 20 years of development, technology to generate a mouse hemophilia model has gradually matured. The aim of this paper is to summarize the research progress in generation of a mouse hemophilia model.

【Keywords】 hemophilia; animal models; mouse; gene therapy

血友病 (hemophilia) 是由编码凝血因子 VIII (coagulation factor VIII, FVIII) 和 (或) 凝血因子 IX (coagulation factor IX, FIX) 的基因突变, 引起的一组 X 连锁隐性遗传性疾病。这种遗传缺陷引起体内 FVIII 和 (或) FIX 的缺乏或者功能缺陷, 从而导致体内凝血功能障碍, 严重威胁患者的生命健康^[1]。疾病可分为由 FVIII 功能异常导致的血友病 A (hemophilia A, HA) 与由 FIX 异常所致的血友病 B (hemophilia B, HB), 绝大多数血友病患者为男性。研究数据表明, 在 5000 男性活婴中大约就有 1 人为 HA 患者^[2]。相比于 HA, HB 发病率较低, 在男性中发病率约为 1/25 000^[3]。血友病的临床表现主要为

[基金项目] “2016 年河北省政府临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目” (361036)。
[作者简介] 李杰 (1993—), 男, 硕士研究生, 专业: 血液内科学。E-mail: hbljj2017@163.com
[通信作者] 闫振宇 (1974—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 止血与血栓。E-mail: hbyzy2011@163.com

反复出血及因血肿压迫所导致的躯体畸形等,严重时可能因颅内部位出血导致患者面临生命危险。该疾病目前尚无有效的治愈方法。血友病的治疗先后经历了从二战时期开始的全血及新鲜冰冻血浆的输注,到冷沉淀,凝血酶原复合物及凝血因子制剂等治疗手段。但是这些血液制品等长期输注,导致了血源性传染性疾病等发病几率的大幅提高。国外学者曾有报告^[4-5],在 20 世纪 80 年代末的美国,受污染的血液制品导致近 50% 的血友病患者感染艾滋病。血浆源性凝血因子或基因重组凝血因子的应用虽然可以降低血源性传染病发生的几率,但是长期使用后体内易产生抗体,即抑制物。这种抑制物的产生,是替代治疗的严重并发症。研究表明,血友病患者体内抑制物的出现,将大幅度降低输注 FVIII、FIX 制剂的治疗效果,患者出血频率增加,出血症状较前明显加重,治疗更为困难^[6]。另一方面高昂的费用使得终生预防性治疗难以广泛开展^[7-8]。临床方面需要新的治疗手段来减少患者疾病及经济负担,需要寻找治愈血友病的治疗方法。血友病作为单基因遗传性疾病中的一种,基因治疗有望成为血友病患者凝血因子浓缩物的治愈疗法,并在国际上得到广泛关注。

在基因治疗中,血友病动物模型的构建在治疗研究中具有重要的基础支持作用。血友病鼠模型的构建成功,极大的促进了血友病基因治疗的研究进展。现就血友病鼠的构建及研究进展予以综述。

1 血友病小鼠模型的初次构建

70 余年前,科学家在自然界中,发现了一种具有类似血友病临床表型的狗,在发现之后,这种狗经过保种、繁育直至 1989 年,基因技术有了一定进展,才被证实这种狗因体内编码 FIX 的基因突变导致该凝血因子活性丧失,其发病机制及临床病理方面与人类 HB 极为类似,从而成为了血友病基因治疗的动物模型^[9]。

1998 年,Monahan 等^[10]发表文献,用这种天然的血友病犬模型进行基因治疗的临床前动物试验,获得了令人满意的结果。但是考虑到这种动物模型资源有限,价格高昂,并且在取材方面费时、费力,这种血友病犬模型不能较为广泛的应用于实验研究。所以,需要进一步找寻或者是构建其它动物模型,供应研究使用。随着基因技术的发展,“基因打靶”已成为一个热点。所谓“基因打靶”是指通过

将目标细胞中的外源 DNA 和染色体 DNA 的同源序列进行同源重组,从而达到修饰染色体上特定基因的目的^[11]。这种基因修饰方法被广泛应用于研究中。

早在 1992 年,Hooper 等^[12]通过应用小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES)基因打靶技术,成功地对小鼠基因组中的片段进行设计及修饰,并且这种修饰后的基因在整体动物水平中得到表达,并且在后代中仍可发现,表明其可以进行基因的传递。在此之后,有文献指出^[13-14],依据基因打靶原理,美国科学家使用 ES 细胞同源重组技术将 *Neo* 基因分别插入编码小鼠 mFVIII 的基因外显子 16 和外显子 17 的 3'末端,成功获得 HA 小鼠模型。

随后,国外学者使用基因敲除方法将 *mFIX* 基因敲除,在 1997 年成功建立了 HB 小鼠模型^[15]。在同一时期,在血友病的基因治疗研究中,我国也取得了巨大的研究进展^[16-17]。但是,这也要求适合的血友病动物模型的产生,来进一步完善临床前实验,评估基因治疗的安全性及有效性。1998 年,戴旭明等^[18]根据基因打靶的基础原理,成功地构建针对小鼠 *mFIX* 基因的基因打靶置换型载体 pMFIX DEL,并于同年报道,利用该载体进行定向敲除小鼠 ES 细胞中 *mFIX* 基因,培育出缺乏 mFIX 小鼠,奠定了建立 HB 的转基因小鼠模型的基础^[19]。

2 血友病小鼠模型特点的研究

随着血友病小鼠模型的构建成功,对于血友病的基因治疗起了重要作用,同时研究人员也对这种模型是否适用基因治疗,进行了探讨及深入研究,最终证实其模型确实适用,并对于基因治疗具有极大的推动潜能。例如,我国学者于 1999 年发表文献^[20]指出,*mFIX* 基因剔除小鼠在繁殖过程中,没有发现突变的基因具有重新回复为正常基因的趋势,也没有观察到未被敲除的负责编码 mFIX 的基因部分被 RNA 转录,并合成蛋白的现象,从而证明这种基因剔除小鼠具有遗传稳定性。同时在该研究中,通过测得凝血功能及凝血因子活性结果,证实这种血友病小鼠模型符合标准,适用于此后的深入研究。另外也指出,测量方式的正确选择对于指标的判读非常重要。孙伟等^[21]对于血友病鼠的饲养及保种进行研究,他们经过 4 年的时间,通过对 *mFIX* 基因剔除小鼠采取选优法,并对于生长、繁殖及临床表现等研究发现,这种动物模遗传符合孟德尔分

离及自由组合定律,从而也证明了其遗传具有稳定性的特点,为进一步的实验研究提供宝贵的证据。此后,他们在 2003 年报道^[22],经过 12 代血友病小鼠模型的饲养及选育工作,建立了成熟的 *mFIX* 基因剔除小鼠的近交系;在研究和充分观察血友病小鼠模型的过程中,发现 *mFIX* 基因敲除小鼠具有低离乳率和高死亡率,考虑与该动物模型本身有出血倾向有关,指出在培育及饲养时,应将构建好的模型小鼠放于单笼精心喂养。该试验为以后的血友病小鼠模型的研究提供了科学的数据支持,并提供了该动物模型的选育及保种等方面的宝贵的实验依据。

3 血友病小鼠模型的改进

随着基因技术的不断发展,人们认识到,位于不同区域的基因或者是不同类型的基因发生改变,往往会产生不同类型的结果。对于血友病这种疾病来说,更是如此。不同区域基因的变化导致凝血因子产生过程中的相应异常,对于体内凝血因子的活性及功能产生不同的影响。这种情况可能造成了血友病的临床治疗方面所遇到的种种问题。这些问题可能与患者的遗传差异导致的凝血因子表型的不同有关^[23-25]。

根据研究,血友病主要由点突变和基因缺失引起^[26-27]。传统的小鼠血友病模型是基于基因打靶原理,用同源重组载体代替大片段,利用大片段的缺失造成 *mFIX* 基因的遗传缺陷^[15]。由此产生的 HB 小鼠模型通常不适合进一步的研究和应用,因为 DNA 的大规模缺失导致对邻近基因的影响。这就要求要有新型的血友病动物模型的产生,以适应研究进展。车文良等^[28]于 2002 年指出,通过在 *mFIX* 基因剔除小鼠的基础上,对含 hFIX 基因的表达载体引入点突变,在 *mFIX* 基因剔除小鼠受精卵雄原核上导入线性化的 pMe4bAIXml 质粒(此质粒为研究中通过采用体外定点突变技术制备的一种含有 IX 基因的表达载体)。在小鼠出生后,测定结果显示小鼠体内含有目的基因,说明成功地构建出了 HB 小鼠模型,这种动物模型是对于之前的传统的基因打靶法构建血友病小鼠模型进行的改良。

尽管早在上世纪 90 年代,HA 小鼠模型就初次构建成功,但是对于我国科学研究者来说,这种动物模型在引进手续、费用等方方面面的问题制约着国内研究的发展。为此,我国学者努力尝试制备血

友病鼠模型。并于 2010 年指出,成功构建了我国第一例 HA 小鼠模型。在实验研究中,匡颖等^[29]通过采用 ET 克隆、胚胎干细胞同源重组和四倍体囊胚补偿技术繁育小鼠后,测量各项指标,该动物模型符合 HA 的临床表型,适用于 HA 的研究,这种 HA 小鼠模型的成功建立,为以后的研究创造了可靠的实验支持条件,提供了可靠的实验依据,促进了基因治疗的发展。

在此之后,随着各种技术展开,研究方面的深入等,逐渐出现了以锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)为核心的基因编辑技术和以类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)为核心的基因编辑技术。有研究指出,ZFN 基因编辑技术,因其设计复杂,脱靶效应高等缺点,尚需完善^[30]。

4 锌指核酸酶技术构建血友病鼠模型

2014 年,国外学者指出^[31],通过 ZFN 技术构建了血友病大鼠模型,相比于血友病小鼠模型,其采血量及自发性出血等方面的问题得到解决,推测其适用于实验研究。其后,在该鼠模型的基础上进行其它有关血友病疾病等方面的深入展开。2016 年, Sørensen 等^[32]指出,他们在血友病大鼠模型的基础上构建出血友病性关节炎的动物模型,推动了血友病性关节炎的进一步研究。同年, Lövgren 等^[33]也指出,在血友病大鼠中,关节出血将使应用 FVIII 制剂时,抗体(即抑制物)的产生几率增加,进一步加重疾病负担。2018 年, Christensen 等^[34]在血友病关节炎鼠模型的基础上进行研究,并指出血友病患者关节软骨和骨退化,与血流有必要的相关性,而不仅仅是炎症的影响。

5 CRISPR/Cas 系统构建血友病鼠模型

CRISPR, 全称为“clustered regularly interspaced short palindromic repeats”,是一种广泛地存在于细菌及古细菌的基因组中的 DNA 重复序列; Cas 是 CRISPR 的临近的相关基因。CRISPR 是 1987 年日本学者^[35]在研究大肠杆菌碱性磷酸酶基因时首次发现的;其具有 14 个长度为 29 bp 的重复片段和 32~33 bp 的非重复片段,这些片段以间隔的方式连接以形成短回文重复序列结构。但是当时限于种种原因,未予重视,并没有深入的进行研究。直到 2002 年它才正式命名为“clustered regularly

interspaced short palindromic repeats”, 即“CRISPR”^[36]。此后,对于 CRISPR 的研究逐渐开展。至 2013 年,CRISPR 作为一种基因编辑技术由《Cell》报道出来,该技术称为“CRISPR/Cas9 介导的打靶系统”^[37]。CRISPR/Cas9 系统原本是一种在长期演化过程中形成的获得性免疫防御系统,经过人工改造,CRISPR/CAS9 系统已成为以 RNA 导向的基因组编辑技术;该系统可分为 I 型、II 型、III 型三种类型^[38-39]。其中,II 型 CRISPR/CAS 系统由于其相对简单的工作组成而广泛用于基因编辑或基因沉默。该技术对比于之前已有技术,具有着其自身的优势。在此之后,该技术被广泛应用于各个科学的研究中^[40-55]。

CRISPR/Cas 系统基因编辑技术的发展,对于基因修饰小鼠模型的构建具有着极大的促进作用。例如:2014 年,马元武等^[56]在研究胰岛素受体底物 1(*IRS1*)基因与代谢病之间的关系,通过 CRISPR/Cas 系统构建成功 *Irs1* 基因敲除大鼠,为研究提供了必要的动物模型。2015 年白敏等^[57]指出,利用 CRISPR/Cas9 技术,成功构建了一种小鼠模型,这种小鼠模型具有特定的位点突变。同年,李彦锋等^[58]通过 CRISPR/Cas 系统靶向敲除 *Fscb* 基因,构建成功 *Fscb* 基因敲除小鼠模型,为进一步研究 FSCB 蛋白在精子鞭毛运动和获能中的作用奠定了基础。王伟等^[59]通过 CRISPR/Cas9 系统靶向敲除技术成功建立了 *Tlr3* 基因敲除小鼠模型。这些研究指出 CRISPR/Cas 系统基因编辑技术在小鼠或者是大鼠体内是可行的,提供了可行性的证明,同时也为血友病鼠模型的构建改良提供了思路。使研究人员认识到可以应用 CRISPR/Cas 系统原理构建血友病即凝血因子基因敲除小鼠。

汪启翰等^[60]于 2013 年提出应用 CRISPR/Cas 系统构建 HB 小鼠模型,在研究中,利用 CRISPR 系统,在 mFIX 基因第 8 外显子核心功能区设计一个靶点,通过体外转录 Cas9 酶及 gRNA 并显微注射小鼠单细胞期受精卵进行 mFIX 定点的基因编辑。通过测量各项指标,较为符合血友病表型。紧随其后,于 2015 年^[61]发表文献指出,依据 CRISPR/Cas 系统基因编辑技术,进行 mFIX 基因敲除,成功构建的 HB 小鼠模型。在此研究中,也证实了减少 CRISPR/Cas 系统基因脱靶效应的方法,即通过对 Cas9 核酸酶蛋白的切割域进行突变,利用修饰型的 Cas9 核酸酶断裂 DNA 双链的其中一条链^[62]。2016

年,关玉婷^[63]发表文献,利用 CRISPR/Cas9 技术将 Cas9 基因、sgRNA 和 ssODN 注射到小鼠单细胞胚胎中,成功构建了模拟病人新突变的点突变小鼠 *F9^{Y381D}*。同时还成功制备了 *F9^{Y381S}* 突变小鼠及第 383 位氨基酸突变为终止密码子的敲除小鼠 *F9^{383STOP}*。同年,常士伟^[64]指出,通过 CRISPR/Cas9 技术能够成功的制造出 FVIII 基因敲除即 HA 小鼠模型。这两个研究进一步证明 CRISPR/Cas9 技术在血友病小鼠模型的制作中,具有着强大的执行力。

6 总结及展望

血友病作为一种常见的血液性疾病,对于患者极易造成躯体畸形,严重时甚至危及生命。目前尚无治愈方法,我国治疗手段主要为替代治疗,疗效不持续,治疗费用高昂,我国患者绝大多数不能承担终身性预防治疗。其作为一种单基因遗传性疾病,基因治疗是最有望成为其治愈的方法。最早于 1987 年开始,国际上就有关于血友病基因治疗的研究展开。随着研究的深入开展,血友病动物模型成为其不可或缺的一种必要条件。即使在自然界中存在天然的血友病动物,但其资源有限,获取困难,不易于广泛地推展于实验研究。因此,人为构建血友病动物模型是大势所趋,也是势在必得。在这些动物模型种,小鼠模型具有其自身的特点,易于获得,便于运输,研究费用较其它大型动物来说,要少于其它动物。这些特点使其在血友病动物模型的构建中脱颖而出。血友病小鼠模型从开始制备到如今已有 20 多年的历史,经历了多种基础原理的发展,多种技术手段的支持。或许直至今日,血友病小鼠模型的构建技术仍有不足之处,如 CRISPR/Cas9 技术的脱靶效应等,这种动物模型仍具有种种尚未发现的需继续改善的缺陷。但是不可否认,这种动物模型的构建,为血友病的研究提供了不可替代的支持条件,加快了血友病的基因治疗的研究步伐,促进了血友病的研究进展。截止目前,血友病的基因治疗研究尚具有不足,尤其是 HA 的研究进展缓慢。研究人员期待有新原理的提出,新技术的产生,应用于血友病动物模型的构建,推动血友病基因治疗的进展。

参考文献:

- [1] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Guidelines for the management of hemophilia [J]. Hemophilia, 2013,19(1):e1-47.

- [2] Callan MB, Haskins ME, Wang P, et al. Successful phenotype improvement following gene therapy for severe hemophilia A in privately owned dogs [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151800.
- [3] World Federation of Hemophilia. Report on the annual global survey 2012 [M]. Montreal: WFH, 2013, 10.
- [4] Evatt BL. The tragic history of AIDS in the hemophilia population, 1982–1984 [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(11): 2295–2301.
- [5] Ragni MV, Winkelstein A, Kingsley L, et al. 1986 update of HIV seroprevalence, seroconversion, AIDS incidence, and immunologic correlates of HIV infection in patients with hemophilia A and B [J]. *Blood*, 1987, 70(3): 786–790.
- [6] Manco-Johnson MJ, Riske B, Kasper CK. Advances in care of children with hemophilia [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2003, 29(6): 585–594.
- [7] Stonebraker JS, Brooker M, Amand RE, et al. A study of reported factor VIII use around the world [J]. *Haemophilia*, 2010, 16(1): 33–46.
- [8] Stonebraker JS, Bolton-Maggs PHB, Brooker M, et al. A study of reported factor IX use around the world [J]. *Haemophilia*, 2011, 17(3): 446–455.
- [9] Evans JP, Brinkhous KM, Brayer GD, et al. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(24): 10095–10099.
- [10] Monahan PE, Samulski RJ, Tazelaar J, et al. Direct intramuscular injection with rAAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia [J]. *Gene Ther*, 1998, 5(1): 40–49.
- [11] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination [J]. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292.
- [12] Hooper ML. Embryonic stem cells: introducing planned changes into the animal germline [M]. Chur: Harwood Academic Publishers; 1992: 1–4.
- [13] Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, et al. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A [J]. *Nat Genet*, 1995, 10(1): 119–121.
- [14] Bi L, Sarkar R, Naas T, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies [J]. *Blood*, 1996, 88(9): 3446–3450.
- [15] Lin HF, Maeda N, Smithies O, et al. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B [J]. *Blood*, 1997, 90(10): 3962–3966.
- [16] Hsueh JL. Clinical protocol of human gene transfer for haemophilia B [J]. *Hum Gene Ther*, 1992, 3(5): 543–552.
- [17] Brownlee GG. Prospects for gene therapy of haemophilia A and B [J]. *Br Med Bull*, 1995, 51(1): 91–105.
- [18] 戴旭明, 薛红, 杨桦, 等. 基因打靶置换型载体的构建和应用研究 [J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(1): 5–8.
- [19] 戴旭明, 薛红, 杨桦, 等. 小鼠胚胎干细胞凝血因子 IX 基因的定向敲除 [J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(1): 1–4.
- [20] 陈立, 周虹, 王健民, 等. 凝血因子 IX 基因剔除小鼠遗传稳定性及其临床表型研究 [J]. 复旦学报(自然科学版), 1999, (4): 435–438.
- [21] 孙伟, 郝光荣, 崔淑芳, 等. 凝血因子 IX 基因剔除小鼠的选育研究 [A]. 中国实验动物学会青年科技协会. 中国实验动物学会青年科技协会第二届学术研讨会论文汇编 [C]. 中国实验动物学会青年科技协会: 2001: 4.
- [22] 郝光荣, 孙伟, 胡卫江, 等. 凝血因子 IX 基因剔除小鼠近交系的建立 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 200–202.
- [23] Ho AY, Height SE, Smith MP. Immune tolerance therapy for haemophilia [J]. *Drugs*, 2000, 60(3): 547–554.
- [24] Kaufman RJ. Advances toward gene therapy for hemophilia at the millennium [J]. *HumGene Ther*, 1999, 10(13): 2091–2107.
- [25] Gill JC. The role of genetics in inhibitor formation [J]. *Thromb Haemost*, 1999, 82(2): 500–504.
- [26] Roberts HR. Molecular biology of hemophilia B [J]. *Thromb Haemost*, 1993, 70(1): 1–9.
- [27] Giannelli F, Green PM, Sommer SS, et al. Haemophilila B: database of point mutations and short additions and deletions—eight edition [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(1): 265–268.
- [28] 车文良, 贺艳, 姚真真, 等. 基于凝血因子 IX 基因剔除小鼠建立血友病乙转基因动物模型 [J]. 遗传学报, 2002, 29(7): 594–598.
- [29] 匡颖, 王津津, 卢希彬, 等. 应用四倍体补偿技术建立血友病 A 小鼠模型 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(1): 1–6.
- [30] Bhakta MS, Henry IM, Ousterout DG, et al. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly [J]. *Genome Res*, 2013, 23(3): 530–538.
- [31] Nielsen LN, Wiinberg B, Häger M, et al. A novel F8^{-/-} rat as a translational model of human hemophilia A [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(8): 1274–1282.
- [32] Sørensen KR, Roepstorff K, Wiinberg B, et al. The F8^{-/-} rat as a model of hemophilic arthropathy [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(6): 1216–1225.
- [33] Christensen KR, Kjølgaard-Hansen M, Nielsen LN, et al. Rapid inflammation and early degeneration of bone and cartilage revealed in a time-course study of induced haemarthrosis in haemophilic rats [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 58(4): 588–599.
- [34] Lövgren KM, Søndergaard H, Skov S, et al. Joint bleeds increase the inhibitor response to human factor VIII in a rat model of severe haemophilia A [J]. *Haemophilia*, 2016, 22(5): 772–779.
- [35] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [36] Jansen R, Embden JD, Gastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [37] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [38] Bikard D, Marraffini LA. Innate and adaptive immunity in

- bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(1): 15-20.
- [39] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338.
- [40] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-229.
- [41] 李明辉. 罗非鱼基因敲除技术的建立及其在性别决定与分化研究中的应用[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [42] Li DL, Qiu ZW, Shao YJ, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 681-683.
- [43] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [44] Li W, Teng F, Li TD, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684-686.
- [45] 陈永昌, 牛显宇, 季维智. 通过 CRISPR/Cas9 和 TALENs 介导的基因打靶技术获得基因修饰的猴模型[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(05): 557-560.
- [46] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [47] 梁振伟, 饶书权, 沈岩, 等. 通过 CRISPR/Cas9 系统敲除人源 PDE10A 基因[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(4): 439-443.
- [48] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [49] 蔡刘体, 陈兴江, 刘艳霞, 等. 噬菌体治疗中细菌对噬菌体的抗性[J]. *生物技术通报*, 2014(7): 33-36.
- [50] 崔玉军. 鼠疫耶尔森氏菌基因组多态性数据库及鉴定溯源系统的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [51] 赵飞. 鸡肉中沙门菌的定量检测及分离株 CRISPRs 分子亚型分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [52] 狄慧玲, 闫鹤, 石磊. 食源性单核细胞增生李斯特菌 CRISPR 结构的研究[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(08): 64-69, 237.
- [53] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691-693.
- [54] Li JF, Norville JE, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688-691.
- [55] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [56] 马元武, 马婧, 路迎冬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1(Irs1) 基因 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(3): 55-60.
- [57] 白敏, 李崎, 邵艳姣, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建定点突变小鼠品系 [J]. *遗传*, 2015, 37(10): 1029-1035.
- [58] 周庭友, 孙中义, 张勇, 等. 鼠 fscb 基因靶向敲除载体的构建及动物模型的建立 [J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(15): 1527-1533.
- [59] 王伟, 姜雪婷, 李永青, 等. 应用 CRISPR/Cas9 技术建立 TLR3 基因敲除小鼠模型 [A]. 中国畜牧兽医学会生物技术学分会、中国免疫学会兽医免疫分会、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、兽医生物技术国家重点实验室. 中国畜牧兽医学会生物技术学分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第十二次学术研讨会论文集 [C]. 中国畜牧兽医学会生物技术学分会、中国免疫学会兽医免疫分会、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、兽医生物技术国家重点实验室: 中国畜牧兽医学会, 2016: 1.
- [60] 汪启翰, 怀聪, 孙瑞林, 等. 利用 CRISPR 系统高效快速构建血友病 B 小鼠模型 [A]. 中国遗传学会. 中国遗传学会第九次全国会员代表大会暨学术研讨会论文摘要汇编 (2009-2013) [C]. 中国遗传学会: 中国遗传学会, 2013: 1.
- [61] 汪启翰, 怀聪, 孙瑞林, 等. 利用 CRISPR/Cas 系统快速高效构建血友病乙小鼠模型 [J]. *遗传*, 2015, 37(11): 1143-1148.
- [62] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [63] 关玉婷. CRISPR-Cas9 技术在 B 型血友病小鼠模型构建及治疗的应用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
- [64] 常士伟. 利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术构建甲型血友病小鼠模型[D]. 南京: 南京师范大学, 2016.

[收稿日期] 2018-11-27