

孙路,付函君,刘云鹏,等. 转基因人源化 ACE2 裸小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 408-415.

Sun L, Fu HJ, Liu YP, et al. Establishment of transgenic humanized ACE2 nude mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 408-415.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.014

转基因人源化 ACE2 裸小鼠模型的建立

孙路,付函君,刘云鹏,武婧,林凯丽,石桂英,王敬竹,孙井江,高虹*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 目的 建立 BALB/c-Nude 裸小鼠为背景的人源化 ACE2 (hACE2) 转基因裸小鼠动物模型。**方法** 利用 hACE2 转基因小鼠与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠杂交获得 F1 代,将 F1 代 hACE2 小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠回交获得 F2 代,再将 F2 代 hACE2 小鼠互交获得 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠。对 F3 代中 hACE2 转基因裸小鼠的生长发育、生理指标及免疫指标与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠和 BALB/c-Nude 裸小鼠对比分析。**结果** (1)hACE2 转基因裸小鼠生长发育指标与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠和 BALB/c-Nude 裸小鼠无明显差异。(2)hACE2 转基因裸小鼠生理指标中,建立的 hACE2 转基因裸小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠相似,病理解剖观察发现,小鼠体内均无胸腺。脏器系数结果与 BALB/c-Nude 裸小鼠比较,脾系数和肝系数出现显著性差异($P < 0.05$)。血常规检测指标与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠比较,中性粒细胞百分比(NEU)、淋巴细胞百分比(LYM)和单核细胞百分比(MONO)均出现显著性差异($P < 0.01$)。(3)hACE2 转基因裸小鼠免疫指标中,与 C57BL/6J 野生型小鼠和 hACE2 小鼠比较,CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+、CD45+CD11B+和 CD45+NK+均出现显著差异($P < 0.01$),与 BALB/c-Nude 裸小鼠无明显差异。**结论** 成功建立了 BALB/c-Nude 为背景的 hACE2 转基因免疫缺陷裸小鼠动物模型。

【关键词】 宿主血管紧张素转换酶 2;转基因;人源化;裸小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0408-08

Establishment of transgenic humanized ACE2 nude mouse model

SUN Lu, FU Hanjun, LIU Yunpeng, WU Jing, LIN Kaili, SHI Guiying, WANG Jingzhu, SUN Jingjiang, GAO Hong*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China)

Corresponding author: GAO Hong. E-mail: gaohongdws@aliyun.com

【Abstract】 Objective To establish a transgenic humanized ACE2 nude mouse model against a BALB/c-nude mouse background. **Methods** Female human ACE2 (hACE2) transgenic mice were hybridized with male BALB/c-nude mice to produce an F1 generation. An F2 generation was then obtained by backcrossing the F1 generation hACE2 mice with BALB/c-nude mice, and F3 generation hACE2 transgenic nude mice were obtained by intercrossing the F2 generation hACE2 mice. Finally, F3 hACE2 transgenic nude mice were compared with C57BL/6J wild-type mice, hACE2 mice, and BALB/c-nude mice in terms of their phenotypes, and physiological and immunological characteristics. **Results** (1)There were no significant differences between hACE2 transgenic nude mice and C57BL/6J wild-type mice, hACE2 mice, or BALB/c-nude mice in terms of their phenotypes. (2)hACE2 transgenic nude mice had similar physiological indexes to BALB/c-nude mice and lacked thymuses. However, the spleen and liver indexes differed significantly between hACE2 transgenic nude mice and BALB/c-nude mice ($P < 0.05$). Routine blood indexes also showed that the neutrophil, lymphocyte, and monocyte percentages differed significantly between hACE2 transgenic nude mice and C57BL/6J wild-type mice and hACE2 mice ($P < 0.01$). (3)There were also significant differences in immunological indexes between hACE2 transgenic nude mice and C57BL/6J wild-type mice and hACE2 mice in terms of the percentages of CD3, CD4, CD11B, and natural killer cells ($P < 0.01$), but no significant differences between hACE2 transgenic nude mice and BALB/c-nude

[作者简介] 孙路(1994—),男,研究方向:动物模型制作。Email:Suluuuuu@outlook.com

[通信作者] 高虹(1968—),女,研究员,研究方向:动物模型制作。Email:gaohongdws@aliyun.com

mice. **Conclusions** We successfully established a line of hACE2 transgenic nude mice with a BALB/c-nude mouse background.

[Keywords] angiotensin-converting enzyme 2; transgenic; humanization; nude mouse

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

宿主血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 是一种锌金属蛋白酶,在肺、肠胃及大脑等组织中广泛表达^[1]。ACE2 是 SARS-CoV2 及 SARS-CoV 的受体,在研究 SARS 发病机制和抗病毒药物的评价具有重要作用,也是本次新型冠状病毒的药物治疗及疫苗研发靶点^[2-5]。早在 2003 年,研究者建立了人源化 ACE2 (hACE2) 转基因小鼠动物模型^[6]。由于裸小鼠具有 T 细胞缺乏的免疫缺陷等特点,本研究试图建立一种携带 hACE2 基因的免疫缺陷啮齿类模型,为研发抗 SARS-Cov2 病毒药物和疫苗提供具有免疫缺陷的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 只 SPF 级 BALB/c-Nude 裸小鼠,雄性,10 周龄,23 ~ 25 g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠,10 周龄,23 ~ 25 g,6 只;SPF 级 BALB/c-Nude 裸小鼠,10 周龄,23 ~ 25 g,6 只,购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。SPF 级 K18-hACE2 转基因小鼠,雌性,10 周龄,23 ~ 28 g,10 只,由中国医学科学院医学实验动物所【SCXK(京)2019-0011】提供。

实验动物饲养于中国医学科学院医学实验动物所动物屏障环境【SYXK(京)2019-0014】,设施温度为 21 ~ 26℃、相对湿度为 40% ~ 70%、最小静压差 ≤ 10 Pa、动物光照为 15 ~ 20 lx。实验动物饲养于该设施独立通风笼(IVC)中,实验动物饲养方法严格按照 GB14925-2010 执行,实验动物操作按照《实验动物使用及实验规程国家标准》执行。所有操作均通过中国医学科学院医学实验动物所实验动物福利伦理审查委员会的批准(GH20017)。

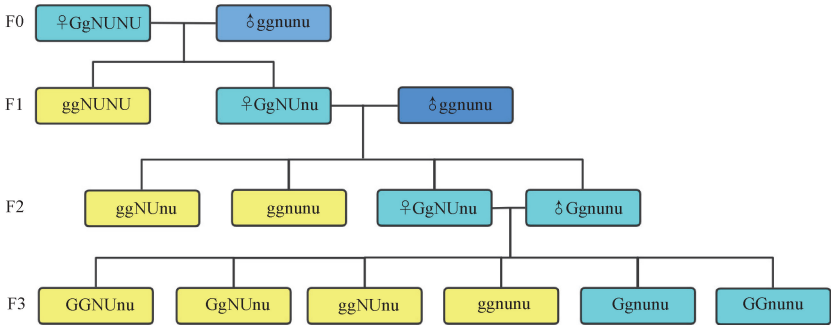
1.1.2 主要仪器

本研究中主要仪器为全自动血液分析仪(西门子 SG9000/ADV7A2120i)、流式细胞仪(BD LSR II Fortessa)、离心机(Thermo Pico17)、动物多功能麻醉机(合浦工贸 HOPE-MED 8160)、小鼠独立回风饲养系统 IVC(苏州顾创 FM1-108)、分析天平(赛多利斯 GL323i-ISCN)。

1.2 方法

1.2.1 hACE2 转基因裸小鼠的建立

hACE2 转基因裸小鼠的培育方式如图 1。首先,采用雌性 hACE2^{+/+}小鼠与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠按照 1 : 1 的比例杂交获得 F1 代小鼠,筛选 F1 代雌性 hACE2^{+/+}小鼠与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠按照 1 : 1 的比例回交获得 F2 代;筛选 F2 代 hACE2^{+/+}小鼠中雄性裸小鼠与雌性 hACE2^{+/+}有毛小鼠互交获得 F3 代,在 F3 代中获得稳定遗传的



注:Gg:hACE2 杂合子;GG:hACE2 纯合子;nunu;裸鼠纯合子。

图 1 hACE2 转基因裸小鼠培育方案

Note. Gg. hACE2 heterozygosis. GG. hACE2 homozygote. nunu. Nude homozygote.

Figure 1 Cultivation scheme of hACE2 transgenic nude mice

hACE2 转基因裸小鼠。各代仔鼠出生 21 d 后断奶分笼饲养。

1.2.2 hACE2 转基因裸小鼠的筛选

对各代 6 ~ 7 日龄小鼠进行剪趾顺序编号,取 2 ~ 5 mm 鼠尾于 1.5 mL EP 管中,通过高盐法提取 DNA,通过 PCR 反应扩增 DNA,琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 鉴定 (PCR 引物为 h-ACE2-MA-s1: 5'-GGACAAGTTTAACCAAGCC-3'; h-ACE2-MA-as1: 5'-CAGCTGAAGCTTGACTGTGAGAT-3')。根据以上结果筛选出 hACE2 基因为阳性的 hACE2 转基因裸小鼠。

1.2.3 实验分组

实验中,取 2 月龄、5 月龄的 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 6 只作为实验组;取 2 月龄、5 月龄的 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、K18-hACE2 小鼠 (hACE2)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 各 6 只作为对照组。

1.2.4 hACE2 转基因裸小鼠生理指标的测定

(1)hACE2 转基因裸小鼠表型及生长指标的测定:自 F2 代雌鼠见栓起,对孕鼠状态进行记录。F3 代小鼠出生后对 hACE2 转基因裸小鼠的体重、身长、尾长等生长发育指标进行记录。

(2)hACE2 转基因裸小鼠脏器系数的测定:取 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 作为实验组,取 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 作为对照组。小鼠称量体重后,由眼眶静脉丛采血,随后进行病理解剖观察,采取肝、脾、肾、心脏、肺、脑等脏器并称重。脏器系数计算公式:脏器系数 = $\frac{\text{脏器重量}}{\text{体重}}$ (mg/g)。通过统计学分析,与对照组进行脏器系数间差异比较。

(3)hACE2 转基因裸小鼠血常规检测:取 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 作为实验组,取 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、K18-hACE2 小鼠 (hACE2)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 作为对照组。通过血液分析仪进行血样血细胞分析,与对照组进行差异比较。

(4)hACE2 转基因裸小鼠免疫指标的测定:取 F3 代 hACE2 转基因裸小鼠 (Nude-hACE2) 作为实验组,取 C57BL/6J 野生型小鼠 (C57BL/6J-WT)、K18-hACE2 小鼠 (hACE2)、BALB/c-Nude 裸小鼠 (BALB/c-Nude) 作为对照组。通过流式细胞术检测 T 细胞总量占白细胞总量百分比 (CD45+CD3+),辅

助 T 细胞量占 T 细胞总量百分比 (CD45+CD3+CD4+),细胞毒 T 细胞量占 T 细胞总量百分比 (CD45+CD3+CD8+),单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞总量占白细胞总量百分比 (CD45+CD11B+) 等指标。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理,各组数据在分析前进行正态性检验和方差分析,正态分布数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hACE2 转基因裸小鼠的筛选

F3 代共有小鼠 44 只,通过 PCR 反应和琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定,hACE2 基因阳性率为 50%。hACE2 基因阳性小鼠中,不同肤色的裸小鼠共占 36.3%。

2.2 hACE2 转基因裸小鼠表型

hACE2 转基因小鼠 (F0 代) 与雄性 BALB/c-Nude 裸小鼠杂交获得的 F1 代小鼠被毛均表现为棕色毛发;F2 代小鼠被毛共有 4 种表型,分别为白色毛发小鼠、棕色毛发小鼠、裸色裸小鼠、黑色裸小鼠 (见图 2)。F3 代表型与 F2 代相同,其中 hACE2 转基因裸小鼠共有 2 种表现型,被毛肤色为裸色裸小鼠和黑色裸小鼠。

F3 代 hACE2 转基因裸小鼠哺乳期生长情况见图 3,新生 hACE2 转基因裸小鼠为粉红色,双眼未睁,耳廓与皮肤相连,脚趾粘连在一起,四肢和躯干向腹部蜷缩。仔鼠在 3 日龄前后耳廓张开,7 日龄前后脚趾完全张开、皮肤变厚部分出现褶皱,9 日龄前后下门齿生长,15 日龄前后睁眼,21 日龄前后活动自如,可自行采食饮水。黑色裸小鼠 7 日龄前后肤色由粉红色逐渐转变为暗黑色,8 周龄时四肢及面部出现暗黑色变淡的现象,16 周龄前后全身颜色退至裸色,其余表型无差异。

2.3 hACE2 转基因裸小鼠生理指标

2.3.1 hACE2 转基因裸小鼠生长发育指标

F3 代 hACE2 转基因裸小鼠由阳性 F2 代 hACE2 转基因小鼠互交繁殖获得。在实验期间,F2 代母鼠妊娠期为 (17.8 $\pm$ 1.7) d,哺乳期为 21 d。F2 代母鼠共产 5 胎次,产仔数量共计为 44 只,每只产胎 (8.8 $\pm$ 1.5) 只,其中裸色裸小鼠出生率为 54.5%,黑色裸小鼠出生率为 6.8% (见表 1)。

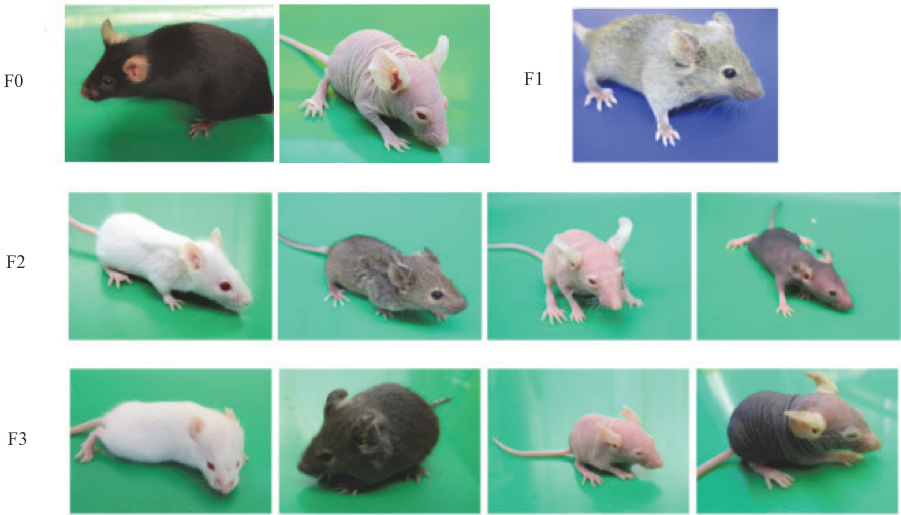


图 2 F0/F1/F2/F3 代 hACE2 转基因小鼠表型
Figure 2 Phenotype of hACE2 transgenic mice of F0/F1/F2/F3

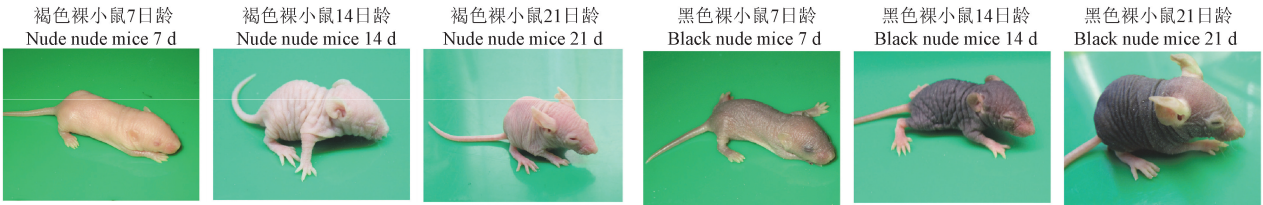


图 3 hACE2 转基因裸小鼠哺乳期生长情况
Figure 3 Growth of hACE2 transgenic nude mice during lactation

表 1 hACE2 转基因裸小鼠生长发育指标测定结果

Table 1 Measurement results of growth and development indexes of hACE2 transgenic nude mice

组别 Groups	妊娠期(d) Gestation period(d)	出生率(%) Natality (%)	出生身长 (cm) Height of born(cm)	离乳身长 (cm) Height of weaning(cm)	出生尾长 (cm) Tail length of Born(cm)	离乳尾长 (cm) Tail length of weaning(cm)	出生体重 (g) Weight of born(g)	离乳体重 (g) Weight of weaning(g)
裸色裸小鼠 Nude nude mice	17.8 ± 1.7	54.5	2.6 ± 0.1	5.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	5.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	7.8 ± 0.6
黑色裸小鼠 Black nude mice	17.8 ± 1.7	6.8	2.9 ± 0.3	5.7 ± 0.3	1.1 ± 0.1	4.8 ± 0.4	1.4 ± 0.1	7.7 ± 1.2

hACE2 转基因裸小鼠身长、尾长测量结果如下,裸小鼠出生时,裸色裸小鼠身长为(2.58 ± 0.13)cm、尾长为(1.30 ± 0.13)cm,黑色裸小鼠身长为(2.85 ± 0.29)cm、尾长为(1.14 ± 0.06)cm。裸小鼠离乳时,裸色裸小鼠身长为(5.72 ± 0.24)cm、尾长为(5.54 ± 0.19)cm,黑色裸小鼠身长为(5.66 ± 0.31)cm、尾长为(4.83 ± 0.37)cm(见图 4)。

hACE2 转基因裸小鼠体重测量结果如下, hACE2 转基因裸小鼠出生时,裸色裸小鼠体重为(1.5 ± 0.1)g,黑色裸小鼠体重为(1.4 ± 0.1)

g。hACE2 转基因裸小鼠离乳时,裸色裸小鼠体重为(7.8 ± 0.6)g,黑色裸小鼠体重为(7.7 ± 1.2)g。hACE2 转基因裸小鼠性成熟时,裸色裸小鼠体重为(7.8 ± 0.6)g,黑色裸小鼠体重为(7.7 ± 1.2)g。两种不同表型的 hACE2 转基因裸小鼠相比较,身长、尾长和体重均无显著性差异(见图 5)。

2.3.2 hACE2 转基因裸小鼠脏器系数

hACE2 转基因裸小鼠解剖,该鼠体内无胸腺,与 BALB/c-Nude 裸小鼠解剖后情况相似,其他器官解剖时眼观无明显差异。

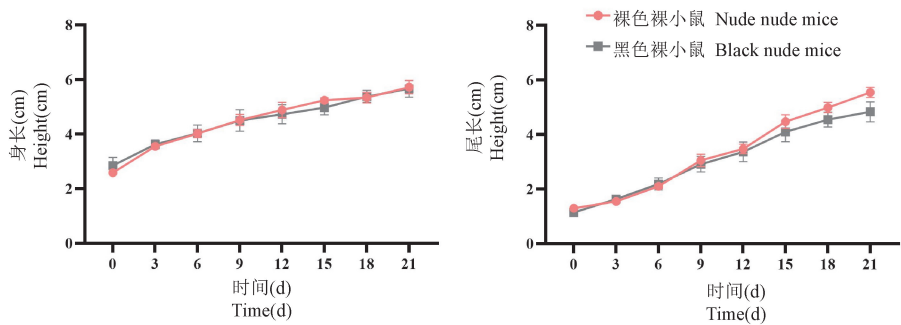


图 4 hACE2 转基因裸小鼠哺乳期身长、尾长

Figure 4 Body length & tail length of hACE2 transgenic nude mice during lactation

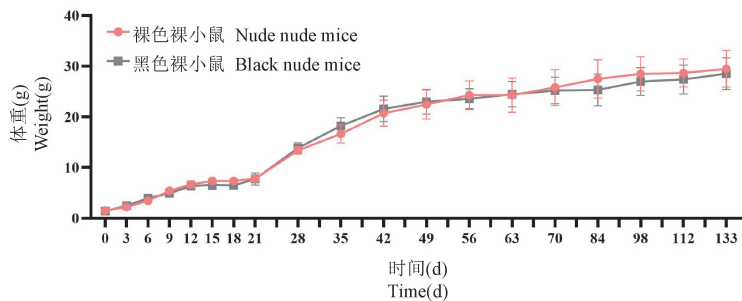


图 5 hACE2 转基因裸小鼠 0 ~ 133 日龄体重

Figure 5 Weight of hACE2 transgenic nude mice at 0 ~ 133 days

根据 hACE2 转基因裸小鼠体重及脏器系数结果比较显示,2 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比,脾系数出现显著性差异($P < 0.05$),其余各项均无明显差异。5 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比,肝系数出现显著性差异($P < 0.05$),其余各项均无明显差异(见表 2 ~ 3)。

2.3.3 hACE2 转基因裸小鼠血常规

血常规检测结果所示,2 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT 相比,NEU、LYM、MONO 出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 hACE2 相比,NEU、LYM、MONO 出现极显著性差异($P < 0.01$),BASO、RBC 出现显著性差异($P < 0.05$);实验组 Nude-hACE2

表 2 C57BL/6J-WT、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 体重及脏器系数结果比较(2 月龄)($n = 6$)

组别 Groups	体重(g) Weight (g)	肝(mg/g) Liver (mg/g)	脾(mg/g) Spleen (mg/g)	肾(mg/g) Kidney (mg/g)	肺(mg/g) Lung (mg/g)	心脏(mg/g) Cardiac (mg/g)	胸腺(mg/g) Thymus (mg/g)	脑(mg/g) Brain (mg/g)
C57BL/6J-WT	24.70 ± 2.20	50.22 ± 5.64	3.69 ± 0.84	12.51 ± 0.61	5.92 ± 0.92	6.11 ± 0.42	1.62 ± 0.54	16.37 ± 3.35
BALB/c-nude	24.80 ± 1.30	62.97 ± 6.54	6.98 ± 1.32	19.01 ± 3.02	6.37 ± 0.51	6.96 ± 0.79	—	16.71 ± 1.90
Nude-hACE2	24.60 ± 3.70	57.06 ± 6.84	4.83 ± 1.84 ^Δ	15.96 ± 2.55	6.10 ± 0.85	6.37 ± 0.70	—	17.15 ± 2.83

注:与 BALB/c-nude 相比,^Δ $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with BALB/c-nude,^Δ $P < 0.05$, (The same in the following tables)

表 3 C57BL/6J-WT、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 体重及脏器系数结果比较(5 月龄)($n = 6$)

组别 Groups	体重(g) Weight (g)	肝(mg/g) Liver (mg/g)	脾(mg/g) Spleen (mg/g)	肾(mg/g) Kidney (mg/g)	肺(mg/g) Lung (mg/g)	心脏(mg/g) Cardiac (mg/g)	胸腺(mg/g) Thymus (mg/g)	脑(mg/g) Brain (mg/g)
C57BL/6J-WT	30.00 ± 3.96	54.22 ± 3.67	3.10 ± 0.85	13.85 ± 0.37	5.93 ± 0.81	6.24 ± 0.30	5.40 ± 9.00	12.33 ± 2.23
BALB/c-nude	29.05 ± 1.46	62.68 ± 4.32	7.08 ± 3.02	18.63 ± 2.36	6.03 ± 0.66	6.05 ± 0.48	—	8.71 ± 11.54
Nude-hACE2	28.33 ± 3.41	54.49 ± 2.59 ^Δ	5.63 ± 1.87	16.41 ± 2.71	6.12 ± 0.77	6.55 ± 0.84	—	12.88 ± 1.51

与对照组 BALB/c-Nude 相比,LYM 出现极显著性差异($P < 0.01$),HGB、EOS 出现显著性差异($P < 0.05$)。5 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT 相比,NUE、LYM、MONO、PLT 出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 hACE2 相比,NUE、LYM、MONO 出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比,NUE、LYM 出现极显著性差异($P < 0.01$)。(见表 4 ~ 5)

2.4 hACE2 基因裸小鼠免疫指标检测

流式细胞术检测小鼠血液中 CD19、CD3、CD4、CD8、CD11B 以及 NK 细胞占比的结果如表 4 所示。2 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-

WT、hACE2 相比,CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+、CD45+CD3+CD8+和 CD45+CD11B+出现极显著性差异($P < 0.01$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT、hACE2 相比,CD45+NK+出现显著性差异($P < 0.05$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比均无显著性差异(见图 6)。5 月龄时,实验组 Nude-hACE2 与对照组 C57BL/6J-WT、hACE2 相比,CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+和 CD45+NK+均出现极显著性差异($P < 0.01$),CD45+CD11B+均出现显著性差异($P < 0.05$);实验组 Nude-hACE2 与对照组 BALB/c-Nude 相比各项指标均无显著性差异(见图 7)。

表 4 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血常规结果比较(2 月龄)($n = 6$)

Table 4 Comparison of blood routine results between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2(2 months)($n = 6$)

组别 Groups	WBC($10^9/L$)	NEU(%)	LYM(%)	MONO(%)	EOS(%)	BASO(%)	RBC($10^{12}/L$)	HGB(g/dL)	PLT($10^9/L$)
C57BL/6J-WT	6.34 ± 1.49	7.33 ± 2.19	87.90 ± 1.96	0.92 ± 0.31	2.15 ± 0.58	0.25 ± 0.08	10.53 ± 0.27	13.88 ± 0.44	861.50 ± 194.52
hACE2	6.69 ± 1.07	8.83 ± 3.30	85.20 ± 3.90	1.08 ± 0.31	3.52 ± 2.27	0.08 ± 0.04	10.77 ± 0.60	13.58 ± 0.89	918.00 ± 420.78
BALB/c-Nude	6.04 ± 2.16	25.93 ± 5.28	64.55 ± 4.16	2.17 ± 0.55	4.93 ± 1.61	0.32 ± 0.12	10.55 ± 0.40	14.65 ± 0.56	848.83 ± 131.91
Nude-hACE2	4.58 ± 1.40	20.03 ± 4.24 ^{**###}	73.43 ± 4.91 ^{**###ΔΔ}	2.38 ± 0.78 ^{**###}	2.45 ± 0.92 ^Δ	0.32 ± 0.18 [#]	9.92 ± 0.43 [#]	13.57 ± 0.48 ^Δ	1098.50 ± 80.93

注:C57BL/6J-WT 相比,^{**} $P < 0.01$;与 hACE2 相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 BALB/c-Nude 比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with C57BL/6J-WT, ^{**} $P < 0.01$. Compared with hACE2, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$. Compared with BALB/c-Nude, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

表 5 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血常规结果比较(5 月龄)($n = 6$)

Table 5 Comparison of blood routine results between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2(5 months)($n = 6$)

组别 Groups	WBC($10^9/L$)	NEU(%)	LYM(%)	MONO(%)	EOS(%)	BASO(%)	RBC($10^{12}/L$)	HGB(g/dL)	PLT($10^9/L$)
C57BL/6J-WT	6.63 ± 0.75	11.10 ± 2.01	85.23 ± 2.02	0.80 ± 0.31	1.78 ± 0.21	0.08 ± 0.04	10.66 ± 0.32	16.22 ± 1.13	1524.67 ± 205.42
hACE2	6.15 ± 1.67	10.47 ± 1.96	85.75 ± 1.89	1.15 ± 0.26	1.55 ± 0.23	0.10 ± 0.06	9.38 ± 1.53	14.40 ± 1.71	1116.67 ± 138.25
BALB/c-Nude	5.03 ± 1.98	34.83 ± 4.96	57.27 ± 4.96	2.10 ± 0.49	3.85 ± 1.73	0.87 ± 0.59	10.12 ± 0.71	15.55 ± 0.94	826.5 ± 338.53
Nude-hACE2	5.30 ± 1.05	22.90 ± 5.83 ^{**###ΔΔ}	68.73 ± 5.51 ^{**###ΔΔ}	2.03 ± 0.53 ^{**###}	4.97 ± 4.76	0.45 ± 0.58	10.76 ± 0.36	16.15 ± 0.67	1032.67 ± 161.91 ^{**}

3 讨论

本研究成功建立了 BALB/c-Nude 为背景的 hACE2 转基因免疫缺陷裸小鼠动物模型。

hACE2 转基因裸小鼠(Nude-hACE2)表现为无毛裸小鼠,生长发育情况与 BALB/c-Nude 裸小鼠相近。通过病理解剖观察,hACE2 转基因裸小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠相同,均缺少胸腺组织。胸腺作为机体重要的淋巴组织,来自骨髓的淋巴干细胞在胸腺中分化为 T 细胞,成熟的 T 细胞再分化为辅助 T 细胞和细胞毒性 T 细胞,随后输出胸腺,进入外周淋巴器官。hACE2 转基因裸小鼠胸腺的缺少导致其无法正常分化 T 细胞,进而造成机体细胞免疫缺陷。血常规指标检测结果显示,hACE2 转基因裸小鼠血液血细胞分布情况与 BALB/c-Nude 裸小

鼠相近,与 C57BL/6J 野生型小鼠、hACE2 小鼠比较,LYM 偏低主要与 hACE2 转基因裸小鼠先天性免疫缺陷有关;NEU、MONO 偏高则可能是由于在环境中饲养中因免疫缺陷造成的某些细菌感染有关。

免疫指标检测结果显示,hACE2 转基因裸小鼠的 CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+以及 CD45+CD3+CD8+低于 C57BL/6J 野生型小鼠,hACE2 转基因裸小鼠的 CD45+CD3+、CD45+CD3+CD4+以及 CD45+CD3+CD8+均与 BALB/c-Nude 裸小鼠相近,反映 hACE2 转基因裸小鼠体内 T 细胞无法正常表达且在免疫水平上与 BALB/c-Nude 裸小鼠具有很高的相似性,无胸腺导致缺乏成熟的 T 细胞,进而导致细胞免疫功能的缺失。

衰老对免疫系统有着深远的影响,免疫系统的固有和适应性免疫应答都随着年龄增长而呈现功

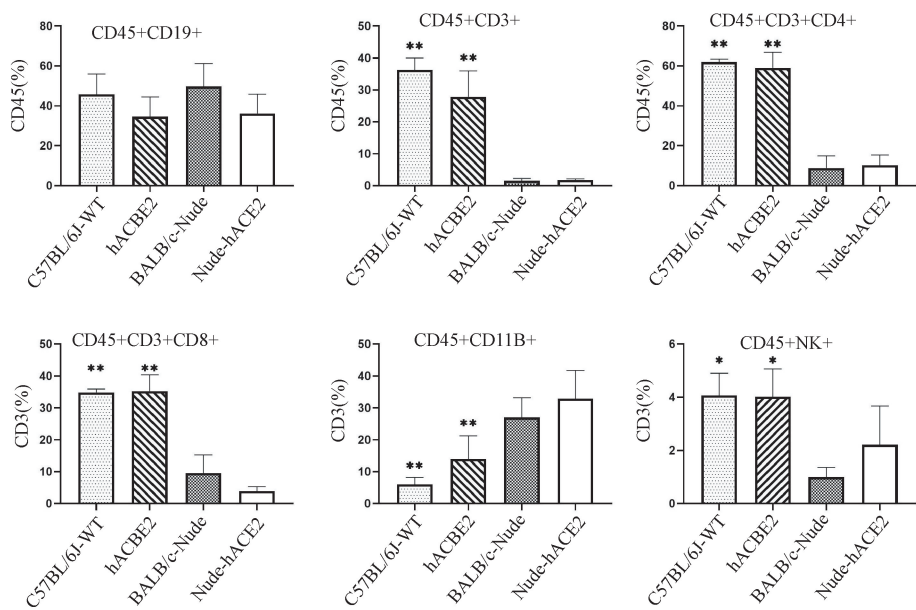


图 6 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血细胞免疫水平比较(2 月龄)

Figure 6 Comparison of immune levels between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2 (2 months)

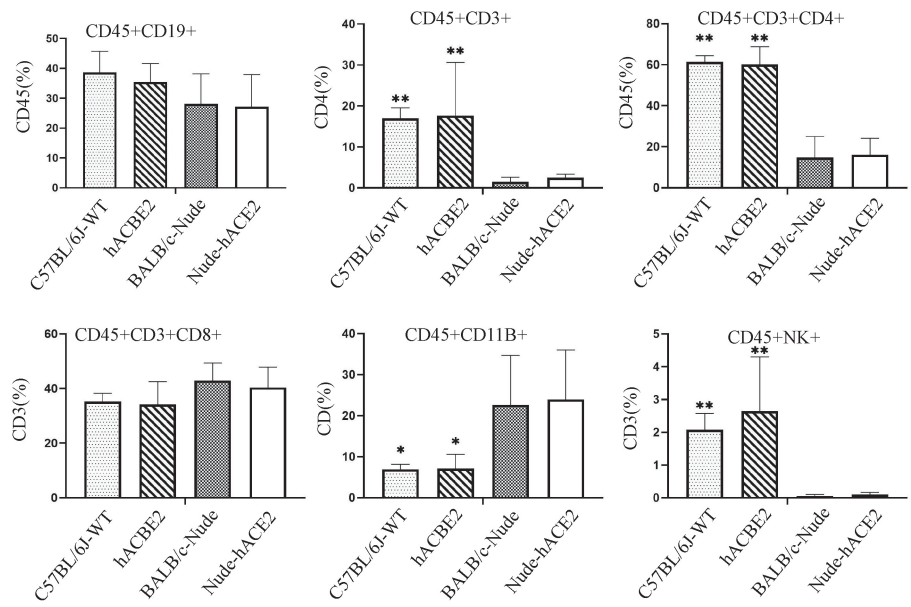


图 7 C57BL/6J-WT、hACE2、BALB/c-Nude 与 Nude-hACE2 血细胞免疫水平比较(5 月龄)

Figure 7 Comparison of immune levels between C57BL/6J-WT, hACE2, BALB/c-Nude and Nude-hACE2 (5 months)

能下降^[7-8]。在老龄化过程中,由于胸腺的萎缩导致小鼠体内 T 细胞数量明显减少,其分化增殖能力下降,诱生新的 T 细胞记忆反应能力也受损,导致 T 细胞库的多样性减少^[9-10]。根据不同月龄的免疫指标结果,裸小鼠因具有胸腺退化的缺陷,自身的细胞免疫功能缺失,故 hACE2 转基因裸小鼠与 BALB/c-Nude 裸小鼠相似,免疫能力自始至终都处于较弱

的水平且免疫能力不随年龄增长而发生改变。同时,hACE2 转基因裸小鼠由于其自身的免疫能力低下,在日常饲养的过程中,随着年龄增加还需对其提供清洁的生活环境、富含营养的饲料等,防止因环境问题或饲养不当而导致动物产生细菌感染或死亡。

hACE2 转基因小鼠作为啮齿类 COVID-19 动物

模型,可应用于 SARS-CoV2 发病机理、疫苗及治疗效果等方面的研究,其主要的优势表现在遗传背景清晰,繁殖周期短,饲养条件可控以及伦理问题较少^[11]。通过与裸小鼠繁育出的 hACE2 转基因裸小鼠不仅具有以上优点,还具有裸小鼠先天性细胞免疫缺陷等特点,作为携带 hACE2 基因的免疫缺陷动物模型,或许可以为 SARS-CoV2 疫苗研究过程中安全性和免疫原性评价等方面提供一些支持。

参 考 文 献(References)

[1] Imai Y, Kuba K, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(15): 2006–2012.

[2] Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(9): 1015–1024.

[3] Lo AW, Tang NL, To KF. How the SARS coronavirus causes disease: host or organism? [J]. J Pathol, 2006, 208(2): 142–151.

[4] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-NCoV spike in the prefusion conformation [J]. Science, 2020, 367(6483): 1260–1263.

[5] Zhu N, Zhang DY, Wang DL, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727–733.

[6] 杨秀红. 人 ACE2 转基因小鼠对 SARS-CoV 的易感性及 SARS

发病机制的实验研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学; 2007.

Yang XH. Susceptibility of hACE2 transgenic mice to SARS-Cov and experimental study on SARS pathogenesis [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College; 2007.

[7] Decman V, Laidlaw BJ, Dimenna LJ, et al. Cell-intrinsic defects in the proliferative response of antiviral memory CD8 T cells in aged mice upon secondary infection [J]. J Immunol, 2010, 184(9): 5151–5159.

[8] Jiang J, Fisher EM, Murasko DM. Intrinsic defects in CD8 T cells with aging contribute to impaired primary antiviral responses [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(6): 579–586.

[9] Bektas A, Schurman SH, Sen R, et al. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging [J]. J Leukoc Biol, 2017, 102(4): 977–988.

[10] Maue AC, Yager EJ, Swain SL, et al. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging [J]. Trends Immunol, 2009, 30(7): 301–305.

[11] 杨钧婷, 王晓堂, 续国强, 等. 新型冠状病毒肺炎动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 111–116.

Yang JT, Wang XT, Xu GQ, et al. Research and progress in animal models of coronavirus disease 2019 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 111–116.

[收稿日期] 2021–11–26