

安徽实验动物信息

ANHUI LABORATORY ANIMAL INFORMATION

2023 年第 4 期总 54 期

安徽省实验动物学会

2023 年 12 月 25 日

目 录

新年寄语 1

[工作动态]

安徽省实验动物地方标准建立 2

长三角实验动物创新联盟成立 2

我校举办安徽省第十七期实验动物从业人员培训班 3

[综合资讯]

写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年系列篇之二十八——小型猪近交系培育及利用 4

责任编辑：田军 刘骅 周宁

电话：0551-63368779

地址：合肥市梅山路 81 号

邮编：230031

E-mail: 945651787@qq.com ahmulh@163.com 632333919@qq.com

新年寄语

星辰日月，岁律更新。值此辞旧迎新之际，学会秘书处向广大会员、向关心和支持学会发展的各级领导、各界朋友，致以诚挚的问候和衷心的感谢！

2023年，是全面贯彻落实党的二十大精神开局之年，是实施“十四五”规划承前启后的关键一年。安徽省实验动物学会全体同仁，立足新时代，密切关注我省实验动物行业动态，积极有序推动学会各项工作开展，圆满完成了上级主管部门部署的各项工作，成功举办了培训班、研讨会等一系列学术活动。目前学会正在积极筹备第五次会员大会暨2024年学术年会，期盼在新的一届理事会的带领下，将一以贯之地深入学习贯彻习近平新时代中国特色社会主义思想，坚持“两个确立”，增强“四个意识”，坚定“四个自信”，做到“两个维护”，不忘初心，牢记使命，不负期待，勇毅前行，将初心和新时代的使命转化为笃行不怠的实际行动，努力推动我省实验动物工作迈上新台阶。

四季轮回，新岁序开，2024年，我们将共创实验动物发展辉煌的明天，共同谱写实验动物科技创新事业灿烂华章！

衷心祝愿大家在新的一年里身体健康、阖家幸福、万事如意！

(安徽省实验动物学会秘书处)

工作动态

安徽省实验动物地方标准建立

为支持我省实验动物产业发展，解决实验动物许可单位申请的关键技术难题，学会将“实验动物地方标准体系研究”纳入到年度工作计划中，经过认真调研、准备，依托安徽省医学科学研究院联合安徽省疾病预防控制中心、安徽医科大学、安徽农业大学等单位申报了“安徽省市场监督管理局 2023 年度安徽省地方标准制定计划项目”2 项，其内容涵盖实验动物环境条件（猪、牛、羊、鸡、鸭、鱼）和微生物、寄生虫学等级及监测（实验猪）；2023 年 7 月 21 日通过立项答辩评估；同年 9 月 12 日获准省市场监督管理局立项计划通知，目前该 2 项标准正在研制过程中。

（安徽省实验动物学会秘书处 供稿）

长三角实验动物创新联盟成立

为贯彻落实中共中央、国务院《长江三角洲区域一体化发展规划纲要》要求，加快推进区域一体化标准体系建设，安徽省、上海市、江苏省和浙江省市场监管局启动了联合开展长江三角洲区域统一地方标准认可工作。以此为契机，在上海召开的 2023 上海实验动物科学论坛暨庆祝上海实验动物研究中心成立 40 周年大会上，由上海实验动物研究中心联合上海市实验动物学会、江苏省实验动物协会、苏州市实验动物协会、浙江省实验动物行业协会、杭州医学院、安徽省实验动物学会、安徽医科大学等单位的代表，作为创始单

位共同推杆，启动长三角实验动物创新联盟。



实验动物是支撑生命科学基础研究、促进生物技术和生物医药产业发展的共性基础和重要保障，也是支撑前沿生物科技创新、推动科技成果转化的重要生物资源。长三角实验动物创新联盟将在实验动物资源调查研究、实验动物标准体系建设、科研合作、专业人才培养、设施建设和质量控制、实验动物福利伦理等方面优势互补、资源共享，共同深化长三角实验动物领域融合发展，为服务长三角地区经济社会发展贡献力量。

（安徽省实验动物学会秘书处 供稿）

我校举办安徽省第十七期实验动物从业人员培训班

2023 年 11 月 8 至 10 日，受安徽省科技厅委托，由我校实验动物中心（安徽省实验动物从业人员培训基地）承办的

安徽省第十七期实验动物从业人员培训班线上开班。来自全省实验动物生产及使用单位、生物制药企业、检验检疫机构、科研院所、医学高等院校等 50 余家相关单位的 254 名学员参加了此次培训。安徽省高新技术发展中心（省基础研究管理中心）副主任费帅致开幕辞，实验动物中心主任严尚学主持开班式。

此次培训邀请了首都医科大学、南京医科大学、上海交通大学、国家卫健委科研所、上海实验动物研究中心、安徽省实验动物学会、中国科学技术大学、安徽医科大学等单位资深专家进行网络授课。授课内容包括实验动物许可管理、实验动物质量控制、实验动物环境设施的使用和管理、实验动物福利与伦理、实验动物生物安全防控、动物实验质量控制等，既有实验动物宏观政策管理、国内外的最新进展，也有局部设施管理细则和具体的动物实验操作讲解，课程设置合理，内容丰富，受到参培学员的一致好评。

此次培训共有 218 名学员顺利获得安徽省实验动物从业人员资格合格证，对加强安徽省实验动物从业人员队伍建设，规范从业行为，提高职业能力和行业水平有很好的推动作用。

（安徽医科大学实验动物中心 供稿）

综合资讯

写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年系列篇
之二十八—小型猪近交系培育及利用

摘要：1988 年《实验动物管理条例》发布实施，在实验动物工作规范化、法制化管理，保障实验动物和动物实验的质量，推动我国科技发展和民生保障等方面发挥了重要作用。特别是在实验动物资源标准化、新品种/品系开发和动物模型创制方面，取得了令人瞩目的成果。为此，借“科技资讯”之窗，陆续推出我国实验动物专家在此领域所作的工作及取得的应用成果。

编者：资源增量是实验动物科技发展的核心任务，是实验动物对生命科学研究提供支撑和服务的基础和保障。自上世纪 80 年代以来，我国老一辈实验动物科学家苦心孤诣，在实验动物资源研发工作中取得的多项开创新成果。

小型猪近交系培育及利用

——记五指山小型猪的标准化与应用成果三十年（续）

冯书堂

北京盖兰德生物科技有限公司

4、国际首个小型猪近交系育成与鉴定（2005-2015）

为实现 WZSP 近交系实验动物标准化奋斗目标，科技部先后以社会公益性重点专项，我国小型猪实验化培育研究（2001DIA40036，2002-2006）；“十五”攻关项目：实验用小型猪种质资源保存与生产基地建设（2004BA717B-01，2005-2008）；“十五”攻关项目：实验用小型猪质量控制标准和规范，（2004BA717B-01，2005-2008）、和国家高技术研究发展计划(863 计划)：实验用小型猪重大疾病模型研发及其专门化品系培育（2012AA020603）(2012--2015)、国家自然科学基金项目：Vimentin 蛋白调控五指山小型猪间充质干细

胞迁移能力的分子机制（31272404）（2013--2016）和农业部五指山猪保种场项目列题、资助，我们完成了 WZSP 实验用标准化研究，大大推进了“小型猪近交系”育成与鉴定工作。此阶段，完成了近交系培育第三项研究成果 3:《国际首例小型猪近交系培育与鉴定》，详细研究成果简介如下：

4.1“近亲繁育”等综合技术措施，育成了国际上首例小型猪近交系[3、5、10]

以 1 公 1 母 WZSP 为系祖的近交 F13-F17 种猪群为材料，按照发明专利（ZL.02149030.9）技术，继续采用“仔配母”、“全同胞”交配，因后代仔猪体型只有 0.35KG 左右，地面上保温难以控制，为提高其产仔成活率，同时采用网上饲养等综合措施，这样也有效地提高了近交猪后代成活率，由地面饲养 F18 的 60%（15/25）提高到笼架饲养 F20 的 92%（23/25），标志着该近交系已跨越“畸形死亡率高、弱仔死亡率高和成活率恢复”三个阶段。目前培育出 F20-F24 近交系群体，建立了近交系谱，F24 近交系数最高达 0.994，育成国际上首个近交系猪。

在培育研究实践中，我们发现 F16、F17 在普通地面条件和环境下，仔猪成活率极低为 20.00%（5/25），相反在网上饲养后 F14 仔猪成活率达到 66.67%（22/33），F19 仔猪成活率可提高到 85%以上。分析其主要原因：由于该近交系仔猪体型极小、体重太轻（03-0.4kg），出生后难以适应外界环境变化；加之随近交代数的推进其基因的纯合度越高，抵抗微生物的感染能力越弱，提示出生后保持外界温度等净化环境，对维持近交品系正常繁育尤为重要。为此，全部采取了笼架结构网上产仔措施，使仔猪成活率逐步提高到正常

水平（见图 17）。即：以 1 公 1 母五指山猪为系祖的近交 F13-F17 种猪群为材料，按照发明专利（ZL.02149030.9）技术，继续采用“近亲繁殖”+笼架结构网上饲养等综合措施，有效地提高了近交系后代成活率，由地面饲养 F18 的 60%（15/25）提高到笼架饲养 F20 的 92%（23/25），标志着该近交系已跨越“畸形死亡率高、弱仔死亡率高和成活率恢复”三个阶段[3]。



图 17 净化培育与笼架饲养

4.2 喜获近交 F20 个体，标志小型猪近交系培育成功

2009 年 3 月 23 日 F20 仔猪顺利生产（见图 18），建立了完整的近交系谱，其近交系数最高达 0.991，标志着我们已经育成“国际首例小型猪近交系”。在此后的几年里，WZSP 近交系猪繁育成群，标志 1989 年以 1 公 1 母 WZSP 为系祖，历经近 30 年，采用“仔配母”“全同胞”交配、同期发情等综合措施（ZL 02149030.9），逐步解决国际上“近交衰退”的难题，跨越畸形死亡率高、弱仔死亡率高和成活率恢复三个阶段。目前培育、组建 F20-F26 近交系种群，建立了完整的近交系谱，近交系数高达 0.996，高于国外最高水平（近交系数 0.75），并经异体皮肤移植、全基因组序列测定、猪高

密度 SNP 芯片等多方鉴定，证明：全球首个大型哺乳动物近交系猪培育的成功[5、6、7、8、10]。



图 18 F20 降生

4.3 标准化培育的WZSP近交系具有鲜明的体型外貌和生物学种质特征

“小型猪近交系”具有明显的外貌特征（见图19）：头戴白星、嘴稍长、耳小直立、体毛色上半部为黑、下半部为白，四肢矮系，4-5月龄性成熟，因体型小7月配种为宜，窝产仔6-8头，最高10头。出生体均重 $0.33\pm 0.083\text{Kg}$ 、1月龄为 $2.94\pm 0.55\text{Kg}$ 、2月龄为 $5.55\pm 1.30\text{Kg}$ 、6月龄为 $13.43\pm 3.27\text{Kg}$ 、成年体高45cm、体长72cm,成年体重（24月龄） $35\text{kg}\pm 3.27\text{Kg}$ 。其体型小、性成熟早、繁殖率较高、不含PERV-C型基因、不含应激反应基因，免疫代谢等基因与人类有较高的同源性等特点，为其重要的生物学种质特征和开发利用依据[5]。



图 19 培育的新品系与原始品系个体图比较

4.4 近交系鉴定创新方法研究

2009年3月，随着F20降生近交系初获成功。此后，近交系大量扩繁与生产应用，其质量鉴定和标准提到议事日程。当时，经查新证实国内、外均无近交系猪培育成功报道，更无鉴定方法和标准。因此，确立了借鉴、近交系小鼠的经典的皮肤移植鉴定方法，来创建近交系猪的鉴定方法和建系标准，尤其要发现与海南五指山猪种间区别，并由第三方提供研究结果，才能向世人提供科学、可信证据。基于分子生物学全基因组测序、猪高密度SNPs芯片等先进的技术，我们制定后期近交系品种培育技术方案：

4.4.1 创建了猪异体皮肤移植鉴定方法，证明该近交系培育成功[6]

2013年与解放军总医院合作首次开展近交系猪异体皮肤移植鉴定研究，技术包括：皮片处理移植、形态学观察、HE染色、Masson染色、免疫组化、及免疫排斥相关因子含量变化等。创建了猪近交系异体皮肤移植鉴定方法，近交系

异体皮肤移植未发生免疫排斥反应，验证其免疫抗原具有高度的同质性，免疫抗原高度一致。分子遗传学研究证明7号染色体与免疫相关的基因几乎全部纯合，为其未发生免疫反应提供了理论依据（见表4）。证明该近交系培育成功。经查新证实国内、外未见报道。

表 4 F20-22 48 个体 7 号染色体与免疫相关的基因几乎全部纯合

ID	Name	Synonym name	F ₂₀	F ₂₁	F ₂₂
ENSSSCG00000001341	SLA-11	ALGA0039611	0	0	0
ENSSSCG00000001341	SLA-11	ALGA0039607	0	0	0
ENSSSCG00000001379	TUBB	BGIS0000638	0	0	0
ENSSSCG00000001394	SUSC-MIC1	H3GA0020436	0	0	0
ENSSSCG000000024161	SLA-7	ALGA0039649	0	0	0
ENSSSCG000000025071	BTNL2	H3GA0020483	0	0	0
ENSSSCG00000001453	SLA-DRA1	DIAS0002153	0.44	0.31	0
ENSSSCG000000031010	SLA-DRB4	ALGA0039730	0	0	0
ENSSSCG000000031032	SLA-DRB3	MARC0058875	0.44	0.31	0
ENSSSCG000000001459	SLA-DOB	ASGA0032113	0	0	0
ENSSSCG000000001469	DMB	DBUN0000378	0	0	0
ENSSSCG000000001472	SLA-DOA	MARC0000730	0	0	0
ENSSSCG000000001472	SLA-DOA	M1GA0009826	0	0	0

4.4.2全基因组序列分析、基因纯合高达60%，验证近交系培育的科学性[7]

2012年由第三方华大基因组，完成WZSP近交系的全基因组序列分析，证实全基因组2.5GB、共注释出20,326个基因，其中有18,000个基因和人等近源物种有同源关系，平均蛋白的相似度达到85%以上；全基因组纯合度类似近交系鼠高达60%，而非近交系动物仅能达到8-11%，是人类理想的“动物模型”。并验证了该近交系猪育成的科学性。研究成果2012年发表于《GigaScience》后已被Nature等刊物引用，《Science Daily》撰文评价该近交系遗传基因高度纯合，是

一种理想的实验动物模型。

4.5猪高密度SNP芯片测试，证明一种新品种猪诞生[1、5、8]

创新了猪近交系全基因组水平验证策略及手段，利用猪高密度SNP芯片技术对比测试该近交系和海南五指山猪，发现该近交系6万多个SNP中80%以上纯合，与近交系小鼠相似，3个世代、连续145 SNP个长幅度纯合已授权发明专利(ZL201410562272.0)(见图20)，申报美国发明专利已公示(PCT/CN2014/000937)，而海南五指山猪几乎全部处于弥漫性、无规律的高度杂合状态；其多维尺度(MDS)、遗传混合评估和传关系聚类进一步分析，同样证实与海南五指山猪遗传基础本质不同，为一种新的种猪遗传资源。

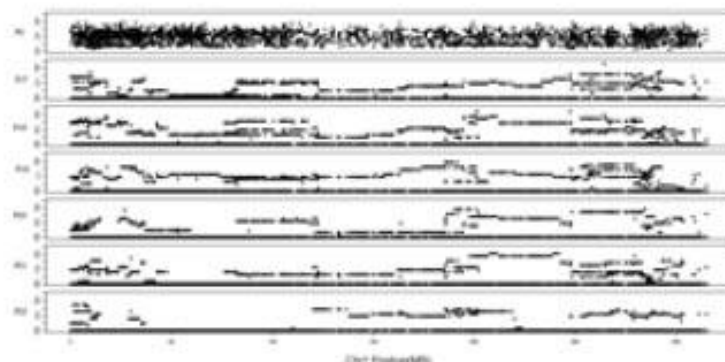


图 20 近交系和海南五指山猪基因型进行系统分析对照

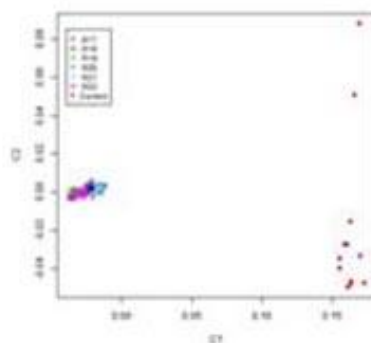


图 21 近交系和海南五指山猪多维尺度 (MDS) 分析，横坐标维度 C1，纵坐标维度 C2

4.6揭示近交系猪遗传规律，发现“不纯合”等位基因和杂合度为“1”遗传现象[1、5、8]

利用微卫星技术在标准化研究中发现：随近交代数推进其群体微卫星等位基因纯合逐步提高，等位基因数越来越少；部分基因较早纯合、多数基因逐步纯合、少数基因不纯合的遗传变化规律。如，家系IF19-F2153头个体中14个具有多态性微卫星位点共检测到28个等位基因，其中F19、F20、F21分别检测到28、26、24个，每个位点各仅有2、1.86、1.7个，但sw936位点88pb为其特有等基因一直处于高度杂合状态，而与海南五指山猪每个位点均具有多态性（10个左右）。“五指山小型猪的一种分子标记及其应用”，已授权发明专利（ZL2005 1000894.2）。

利用猪高密度SNP芯片测定研究发现：该近交系F17-22 52,258个SNPs纯合率高达80.0%（与近交系鼠近似），而海南五指山猪几乎所有染色体区域表现高度杂合，呈弥漫性、均匀性、无规律分布。证实其遗传高度纯合与海南五指山猪遗传基础本质不同，是一种新的遗传种质资源；随近交世代推进其SNPs杂合数逐步降低，但平均基因组杂合度又趋于上升，各染色体之间杂合度又不相同，均有一定数量、长度不等的基因组区域、随近交世代的递增逐步有规律的纯合，但却维持马赛克动态，如雌激素受体（ER）基因等处于基因组杂合区域，与其繁殖和生长发育高度关联，它确保了近交系得以完成精子或卵子发生、受精、胚胎及个体发育等“生命过程”，验证了“不纯合基因”现象存在，尤其群体等位基因杂合度为“1”的位点，在海南五指山猪相应的位点上均未发现(见表5)。已授权发明专利2项（ZL 201410152864.5、ZL

201410152868.3)，从分子遗传学验证，该近交系为一种新的遗传资源。

表 5：世代中确定的 10 个 SNPs 相关功能基因其杂合度为“1”的位点

Chr	Pos	Gene	Gene involved pathways
1	16767735	ESR1	Gene Expression and Signaling by GPCR.
4	51508361	<u>RIPK2</u>	Signaling by GPCR and Immune System.
7	37570312	FGD2	Signaling by GPCR and Signaling by Rho GTPases.
9	43255454	FDX1	elated pathways are Metabolism and Infectious disease
13	29861003	ABHD5	Lipoprotein metabolism and Metabolism.
13	34681199	PRKAR2A	Platelet activation, signaling and aggregation and Sertoli-Sertoli Cell Junction Dynamics
13	34775057	PFKFB4	Metabolism and Glycosaminoglycan metabolism.
13	35107691	USP4	Signaling by GPCR and TNF signaling
13	88480380		Platelet activation, signaling and aggregation and Sertoli-Sertoli Cell Junction Dynamics
14	30401893	NCOR2	Among its related pathways are Gene Expression and Signaling by GPCR.

4.7 提出 WZS 近交系猪五项鉴定标准、创建了多个鉴定方法[9]

依据国际有关啮齿类近交系鼠类的规定和监测方法，基于该近交系研究结果，首次提出近交系猪鉴定五条标准，即：

1)遗传背景清楚、基因高度纯合，由2头祖代猪连续近交繁育20代以上；

2)建有完整的技术档案和系谱，具有一定的近交系群体；

3)应具有明显的品种体貌、体型特征；

4)近交系猪皮肤异体皮肤移植不发生免疫排异反应；

5)具有特定的分子遗传标记，如特有等位基因、生化遗传位点等分子遗传的检测等方法。

授权多项专利、创建了多个鉴定方法，为该近交系专利产品知识产权保护和利用，提供科学依据。即：部分国家发

明专利（ZL 2005 1000894.2）

4.8利用分子遗传学手段，检测了近交系培育过程[11]

为确保该近交系培育的科学性，我们按照既定的近交系培育技术路线，利用微卫星、SNP等多方法，选择不同染色体、15个具有多态性位点基因，观察诸代群体变化规律，以防在培育过程中遗传污染，检测研究证明确保了近交系培育的准确性。在研究发现：该近交系F13-F22随近交代数推进，其群体微卫星等位基因纯合逐步提高，等位基因数越来越少；部分基因较早纯合、多数基因逐步纯合、少数基因不纯合的变化规律。如，家系I F19-F21 53头个体中同样14个具有多态性微卫星位点共检测到28个等位基因，其中、F19、F20、F21分别检测到28、26、24个，每个位点各仅有2、1.86、1.7个，但sw936位点88pb为其特有等基因一直处于高杂合度状态。而海南五指山猪测试的每一个位点均具有多态性（10个左右），其结果不仅验证了该近交系培育的科学性，证明与海南五指山猪遗传基础本质不同。在研究中的新发现，我们也及时的申报国家发明专利，其中“五指山小型猪的一种分子标记及其应用”已授权发明专利（ZL2005 1000894.2）、国际发明专利（PCT/CN2010/000252）等。

4.9“小型猪近交系”标准化研究，推动北京市实验用猪标准研制与颁布实施[8]



图 22 小型猪近交系 SPF 种猪场及设施

以该“小型猪近交系”品种可近交繁育种质独特优势，1 头供猪 10 头母猪的规模，可保持普通级、清洁级、SPF 级实验用小型猪种群长期正常运转的理论依据，得到上至领导、下至专家们的认同，建立了我国第一个 SPF 级种猪场（见图 20），其设施条件和种群遗传、配合饲料、环境、微生物等数据，为北京市实验用小型猪《地标》的遗传、配合饲料、环境、微生物等研发提供了科学依据。

1) 该近交系和场地设施，为北京市实验用小型猪遗传、配合饲料、环境、微生物、设施的普通级、清洁级、SPF 级等标准制定、颁布实施（DB11/T 828.3 2011，DB11/T 828.5—2011）提供全套科学数据。该标准推进了北京地区乃至全国实验用小型猪标准化、规模化、产业化发展，向社会提供合格的实验用猪，促进我国生物新药研发与应用步伐，为生命科学医学等领域创新、研究和应用奠定了基础，其应用前景广阔。

此外，促进研发的医用异种脱细胞外基质材料取突破性进展，其产品疝生物补片、生物凝胶、生物敷料、肛瘘生物塞等，在大兴高科技园区开始产业化运作；促进研制心血管疾病、糖尿病等多种疾病模型，如，创建疾病模型的技术和组织学、影像学的临床诊断评价体系等，初步揭示了TLR2基因在动脉粥样硬化中的作用机理；促进建立了多种干细胞系，其诱导分化研究取得了突破性进展，其中，用于干细胞培养的灌流装置等，已获得国家实用专利（ZL201020106921.3和ZL 201020106925.1）等，将在造福人类的理论研究和应用中发挥难以估量的作用。它不仅实现了我国猪种质资源创新，而且丰富了大型哺乳动物近交系理论与实践，具同类研究国际领先水平，并至少领先十年。

此阶段，完成了近交系培育第三项研究成果3:《国际首例小型猪近交系培育与鉴定》，2013年第三次通过农业部成果鉴定，农科果鉴字（2013）第024号；附：第三次成果鉴定意见；该研究成果《科技日报》第三次做了报道；近交系成果转让1200万元，作为国家科技成果深化改革成功典型事例，2017年元月2号在《焦点访谈》做了引领报道，产生了重要影响（见图21、22、23）。



图 23 :CCTV-1《焦点访谈》



图 24 成果第三次报道



图 25 第三次鉴定会意见

5、近交系研究成果转化成功、迈向产业化新阶段

WZSP近交系研究成果自2016年成功转让三年来，实现

了“公司搭台，科技人员唱戏”科技创新的体制下，为早日实现WZSP近交系异种移植产业化目标，努力推进近交繁育获得近交系F26，面向高精端实验动物模型应用。同时开展克服异种移植免疫排斥和PERV传染生物安全性两大难题的研发内容。近交系GGTA1/ β 4GalNT2双敲基因克隆猪培育成功，近交系PERV无传染性群体建立，近交系猪-猴异种角膜内皮移植存活298天以上，近交系异种角膜内皮移植获得突破性进展，《WZSP近交系角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变的有效性及安全性临床前试验方案》已通过专家会论证。近交系异种角膜内皮移植第一个产业化项目，已步入有效性及安全性临床前动物试验方案应用新阶段。

近交系、人源化多基因修饰、PERV无传染性猪，将是人类异种移植产业链中理想的供体材料。

5.1五指山近交系双敲基因克隆猪首次育成

众所周知，器官移植是挽救、延长器官衰竭、生命垂危患者生命唯一有效途径。在当前供体器官严重匮乏国际大环境下，异种移植则是解决供体短缺的重要途径。经多年探索，基因修饰猪初步可以解决免疫排斥——阻碍异种移植发展的关键问题，艾默里大学报道移植人源化基因猪 α GTKO+CD55的肾脏移植到猴最长存活时间，已长达存活300天[15]，NIH报道移植人源化基因猪 α GTKO+CD46+TBM的异位心脏，可存活945天[16]，匹兹堡大学报道移植人源化基因猪CD46的胰岛移植，可存活396天[17]，哈佛大学报道人源化基因猪 α GTKO+CMV阴性肝脏，可存活25天[18]，马里兰大学报道移植人源化基因猪 α GTKO+CD46转基因肺脏，可存活7天[19]。因此，可以说基因修饰猪器官异种移植技术，将会开

辟了人类夕阳之路。

目前,大量的经多年探索,基因修饰猪初步可以解决免疫排斥—阻碍异种移植发展的关键问题,艾默里大学报道移植人源化基因猪 α GTKO+CD55的肾脏移植到猴最长存活时间,已长达存活300天[15],NIH报道移植人源化基因猪 α GTKO+CD46+TBM的异位心脏,可存活945天[16],匹兹堡大学报道移植人源化基因猪CD46的胰岛移植,可存活396天[17],哈佛大学报道人源化基因猪 α GTKO+CMV阴性肝脏,可存活25天[18],马里兰大学报道移植人源化基因猪 α GTKO+CD46转基因肺脏,可存活7天[19]由于供、受体组织因子、分子不匹配,发生补体激活和凝血反应,异种器官长期存活还面临着细胞的延缓性排斥反应等[4]。敲除非Gal抗原如NeuGc、 β GalNT2可大大降低抗体介导的排斥反应等[14]。

尤其利用CRISPR/Cas9同时敲除三个关键猪糖分子基因,三基因敲除猪细胞与人抗体反应显著降低[4],2015年底,Science杂志上发表了哈佛医学院George Church研究组的最新成果[21],证实通过CRISPR技术可以一次性失活猪细胞中的62个PERV基因。表明利用CRISPR/Cas9可解决阻碍异种移植发展的关键难题免疫排斥和病毒交叉感染两大难题。依据国际最新研究成果,围绕上述两大难题开展研究,并首选异种角膜组织片加快了产业化研发。现分述如下:

WZSP近交系被视为异种移植研究的优良材料[1、6、7、10]。为了克服免疫排斥问题,与南京医科大学戴一凡课题组合作,利用CRISPR/Cas9技术建立WZSP近交系GGTA1/ β 4GalNT2双基敲除克隆猪。方法:设计合成靶向猪

GGTA1 和 β 4GalNT2 基因的单导向 RNA(single guide RNA,sgRNA), 以pX330质粒为骨架, 分别构建GGTA1和 β 4GalNT2的Cas9打靶载体, 转染至近交系WZSP胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts,PFFs)中, 通过G418药物筛选和测序鉴定获得双基因敲除的单细胞克隆,然后利用体细胞克隆技术(somatic cellnuclear transfer,SCNT)获得双基因敲除的近交系WZSP, 并利用流式细胞技术检测克隆猪外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中 α Gal和Sd(a)抗原的表达。结果: 成功构建GGTA1和 β 4GalNT2基因的Cas9/sgRNA表达载体, 转染后获得双基因敲除的近交系WZSP PFF细胞克隆9个。SCNT获得了11头WZSP近交系双敲基因克隆猪, 其PBMC无 α Gal和Sd(a)抗原的表达。结果表明: CRISPR/Cas9技术可以实现对猪GGTA1/ β 4GalNT2基因的编辑。本实验首次成功制备了WZSP近交系GGTA1/ β 4GalNT2双基因敲除克隆猪, 具有诸多产业化优势。目前, 七头七月龄双敲基因克隆猪已开始进行正常配种、种群扩繁(图: 24)。该双基因敲除克隆猪群, 将为异种移植研究与应用提供了新的供体材料。将拟在GGTA1/ β 4GalNT2双基因敲除克隆猪的Rosa 26位点敲入人的hCD46/hCD55/LEA29YINS/hTBM等不同组合人源化基因猪制作, 培育4、5个基因修饰系列人源化基因修饰猪, 为医用生物辅料和异种移植产品研发奠定了基础。



图 26 6 月龄双敲基因猪

5.2 成功培育出WZSP近交系PERV无传染性新品系

国内外大量的研究证实，PERV基因传染性是阻碍异种移植发展的关键两大难题之一。业已证实，PERV编码有gag、pol、env三个结构基因。国外研究还发现：不同猪种的基因组中均存在60~150个拷贝的前病毒。其中PERV的env基因根据其组成差异，又可将PERV分为A、B、C 3种亚型；PERV-A/C亚型重组病毒的感染性较PERV-A亚型和PERV-B亚型增强近500倍。表明PERV-C存在、参与重组可能增加了PERV传播的风险性等[19、20]。目前Luhanyang[20]等报道（2015）CRISPR/Cas9一次性去除猪内源性逆转录病毒（PERV），可解决因异种移植而导致病毒疾病交叉感染，阻碍异种移植发展的另一关键难题。但有学者（2018）仍提出会导致部分基因拷贝的丢失，引起新的不良遗传现象发生[21]。

据章金刚等，通过我国小型猪品种PERV的检测与筛查研究报道，国内10单位7品种、17种群、共计348个小型猪样品[27]研究证实：我国猪群中普遍存在PERV感染，其中A亚型为74.43%，B亚型95.40%，C亚型为30.46%，且81.61%的

猪存在2种以上亚型病毒混合感染及重组的可能性[27];该近交系基因组中存在PERV-A、B两种亚型,未检测到PERV-C亚型的存在与表达,华西医科大学研究结果也证实了这一特性[4、26]。这就降低了具有较强感染能力的A/C重组毒出现的可能性,并发现有该近交系PERV基因拷贝数少、且无传染性猪个体现象存在。这就为从该近交系群体内筛选PERV无传染性猪群体提供了可能。

自2016年9月至2017年12月,参考美国FDA规定的技术方法[27],进行了选育WZSP近交系PERV无传染性新品系研究,即采用细胞共培养、PCR、RT-PCR及反转录酶活性检测等实验方法,通过初步筛选和确证实验两步技术路线进行筛选,从而筛选获得无PERV传染性的WZSP近交系个体20头。在基因组水平进行验证研究,已初步发现PERV无传染性个体中的PERV前病毒基因序列中的终止子存在(TAA,TGA,TAG)及终止位置,为其PERV无传染性提供了理论依据。申报发明专利二项(201710127536.3、201710418223.3),将为异种移植产业链中提供理想供体材料。有望解决阻碍异种移植发展另一个PERV传染性安全性难题。

5.3猪-猴异种角膜内皮移植处于临床前动物试验阶段

WZSP近交系角膜具有与人类近似的优势。经比对研究证实,WZSP近交系角膜厚度、曲光度及大小,较之其他品种猪近似人类(待发表资料),是人类异种角膜内皮移植理想的供体材料。自2000年起,合作单位北京同仁医院就从事了WZSP近交系-恒河猴穿透性角膜移植研究,通过不断改进移植方法与措施,结合术后结膜下注射复方倍他米松注射液

等，不断取得新进展[22,23]。2016年-2017年公司专业技术人员，按照国际异种移植联合会（IXR），规定的技术方法，完成猪-猴角膜内皮移植7例成功5头，其中最长存活时间已达298余天[24]，猪-猴异种角膜内皮移植取得突破性进展。该技术主要是猪角膜内皮植片较薄（120~150微米），承载异种抗原较少，且完全处于前房免疫偏离状态的保护中，较全层猪角膜移植具有免疫排斥反应小、术后恢复快等诸多优势，且能够在只局部使用激素的条件下维持植片长期存活（大于6个月），该技术更接近人体捐献角膜移植临床应用的实际条件。

角膜内皮细胞有着广阔的开发利用前景。据潘志强研究报道，角膜移植技术分类及其适应症，可将其角膜盲病患者与治疗分为三类，其中角膜病变（感染后）、适合外伤站20%，适于脱细胞角膜治疗；严重的角膜炎、角膜溃疡部分先天性角膜疾病的患者，中央性角膜白斑、角膜变性、圆锥角膜，顽固性角膜炎或溃疡及角膜瘘约占40%，适于脱细胞角膜治疗；其余像白内障术后角膜内皮失代偿即大泡性角膜病变先天性角膜内皮营养不良、外伤性角膜内皮损伤、单纯疱疹病毒型角膜内皮炎、急性青光眼反复发作导致的角膜内皮失代偿等约占40%，适于角膜内皮异种移植治疗。据资料报道，美国每年行角膜内皮细胞移植手术为22,000例。而我国由于角膜内皮异种移植产品短缺，每年移植量不足1000例，而每年此类患者均在8万人以上。所以研发一种替代角膜移植治疗角膜盲病患者恢复光明尤为重要。因此，公司已研发的“一种后弹力层角膜内皮移植术用移植片及其液泡分离制备法”，并授权发明专利(ZL.201610885932.8)；“一种后弹力层

角膜内皮移植术用移植片及其机械制备法”，已申请发明专利(201610885272.3)。为该项技术产品应用，提供了技术支撑。

基于角膜内皮组织片免疫功能的特异性，前期研究WZSP近交系猪-猴异种猪角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变的有效性，已筛选组建20头PERV无传染性新品系，以及我们具备DPF级医用实验用猪的设施和技术条件。经业内专家多次研讨并参阅国内外DPF医用猪标准，已详细制定出《WZSP近交系猪-猴异种猪角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变的有效性安全性临床前动物试验方案》，其内容包括：①动物要求②眼球获取③WZSP近交系猪角膜内皮组织片的制备④WZSP近交系猪-恒河猴异种角膜内皮组织片移植技术等系列配套技术，以及成功评价技术体系。

上述技术方案2018年9月7日已通过业内多方面领域专家论证会，与会专家一致认为：①WZSP近交系PERV无传染性、DPF级供体猪，依据美国FDA推荐的指南、参考湖南省地方标准筛选及培育，可为角膜异种移植临床应用提供安全可靠的供体来源；②WZSP近交系角膜内皮组织片的质量控制包括供体角膜的获取、组织片的制备和制备后的相关检测（角膜组织片内皮细胞密度、均质性、微生物指标），基本达到产品质量管理体系要求；③WZSP近交系角膜内皮移植（猪-恒河猴）动物实验能够证明内皮移植的有效性，猪角膜内皮植片可使受体猴角膜内皮失代偿导致的角膜水肿组织恢复透明及正常厚度，并在较长时间内保持其功能正常；通过术前、术中及术后的相关检测，可初步证明猪-恒河猴角膜内皮移植不具有病毒（PERV等）传染性、长期致癌性

及其他生物安全的风险；④综上所述，WZSP近交系角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变，是缓解目前临床角膜供体短缺的一条有效途径，该角膜内皮组织片的问世将具有显著的社会效益和经济效益，是一项国际领先的创新性、产业化成果。建议：在完成临床前研究的基础上，探索WZSP近交系DPF级角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变的临床研究。

该方案的通过为《WZSP近交系猪-猴异种猪角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变的有效性及安全性临床前动物试验》和《WZSP近交系-恒河猴异种角膜内皮移植有效性及安全性的实验研究》通过“伦理委员会”提供了科学依据。预计2020年开展《WZSP近交系猪-猴异种猪角膜内皮组织片治疗大泡性角膜病变的有效性及安全性临床前实验》。该创新性的产品不仅使盲人患者重见光明，造福人类，而且将是我们认真落实《实验动物标准化》三十年的丰硕成果之一，也必将使我国在此研究领域处于国际领先地位。

6、近交系是特有的种质资源，标准化研究具有广阔的开发利用前景

6.1 WZSP近交系独特种质特性是理想的动物模型

由于该近交系经过30年培育，具有耐近交、遗传稳定，生理解剖、生长发育、器官大小、营养代谢等近似人类，且耐受性强、PERV无传染性等种质特性，是理想的动物模型。已向北京、天津、四川、辽宁等地先后提供上千头实验用猪，成功用于糖尿病、心血管疾病模型、药物鉴定、转基因水稻食品安全、猪-猴肝脏异种移植、生物辅料等诸多方面[3、8、29]。如，近期四川蓝光英诺生物科技股份有限公司经手术试验验证了其耐受性，验证其耐受性强，将生物科技3D打印

血管作为腹髂动脉主动脉移植，近交系比其它猪更加耐受、术后愈合快等优势。已将百余头WZSP近交系，用于3D打印血管临床前大动物验证试验，获得理想结果；关于此特性，北京朝阳医院急诊室在心脏休克恢复研究中，也得到证实，即心脏停止波动8分钟还可复活，其他品种实验猪5分钟则无法复活（未发表资料）；90年代末，北京友谊医院猪肝脏同种异体移植以及中国农科院牧医所回-直吻合术等，均证明该近交系极其器官具有较强的耐受性等特性。

6.2近交系、人源化多基因修饰、PERV阴性猪具有三大优势

大量的研究业已证实，人源化多基因修饰猪(GGTA1/ β 4GalNT2+hCD55、CD46、LEA29YINS EPCR TBM hASGR1等)，可解决异种移植免疫排斥反应[12-14]，此外可近交繁殖，产生1、2头公母基因修饰克隆猪，就可扩群批量生产；PERV无传染性近交系新品系，可避免异种移植人畜共患病毒风险，无疑是医用敷料人工肝等产品研发供体素材；近交系基因高度纯合、遗传稳定，便于医用产品标准化、商品化、规模化生产，其近交繁育使其SPF生产、成本低、效益高[3、8、22-28、29]。该近交系、人源化多基因修饰、PERV阴性猪具有的三大特点，我们可得出如下推断：

近交系+无PERV传染性+人源化基因修饰猪，是理想的异种组织器官移植临床应用材料。

6.3 WZSP近交系实验用猪标准化研究，已列入国家多项异种移植研发课题

该近交系种质特异性，已得到大多数同行专家和领导的认可。为此，30年来先后得到国家科技部、农业部、北京市、

国家自然科学基金委等单位的资助，参加国家多项异种移植相关研发课题三十余项，如：

1)、2017“生物医用材料研发与组织器官修复替代”重点研发专项课题，基因修饰的巴马小型猪和近交系五指山小型猪器官供体(2017YFC11037000)，开启了人源化基因修饰猪及应用研发；

2)、2017“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项课题畜禽疫病防控专用实验动物开发—疫病易感性小型猪筛选(2017YFD0501600)；

3)、科技部“863”计划医用新材料技术领域，基于近交系五指山猪的脱细胞组织基质材料的研发(SQ2014X04D01216)(2014-2018)

4)、国家高技术研究发展计划(863)，实验用小型猪重大疾病模型研发及其专门化品系培育(2012AA020603)(2012-2015)

5)、国家高技术研究发展计划(863)，异种器官移植的前期研究(2003-2005)

国家自然科学基金重大项目：异种器官移植基础性研究(1999-2003)

国家自然科学基金重点项目：五指山猪近交系建系研究(1998-2001)等。

北京市科委项目：农业部“七五、八五、九五”以及历年的五指山种质资源保存研究项目。

6.4产生经济和社会效益

WZSP近交系标准化研发成果，在科技日报、中央电视台等多次报道，尤其是2017-01-02 CCTV-1《焦点访谈》中，

小型猪近交系成果转让成功引领我国科技创新报道，产生了较大的社会影响。近交系标准化研究成果，是创新资源研发过程，也使我们体会到：实现实验用近交系猪标准化路漫漫、希望在！

由2头猪、历经30年实验用猪标准化培育的近交系猪群，已授予国家级首批、唯一一个国家异地保种遗传资源场（N0：C1101001）；实验用猪标准化培育30年后，公司完成A轮融资，我国《实验动物标准化》[30]法规颁布实施30周年之际，五指山小型猪的标准化与应用成果已开始步入产业化快车道。

注：#:此论文内容涉及三十年的研究成果，由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所和北京盖兰德生物科技有限公司及有关合作单位，七十余人参与下完成的，在此深表感谢！并获科技部、农业部、北京市、国家自然科学基金委员会等课题资助：

1、2017“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项课题（2017YFD0501600），畜禽疫病防控专用实验动物开发—疫病易感性小型猪筛选

2、2017“生物医用材料研发与组织器官修复替代”重点研发专项课题（2017YFC11037000），基因修饰的巴马小型猪和近交系五指山小型猪做为异种器官器官供体

3、国家高技术研究发展计划（863），实验用小型猪重大疾病模型研发及其专门化品系培育（012AA020603）

4、国家五指山猪遗传资源场保种项目（2016-2018）等。

作者：冯书堂男，1945年9月生，河北省大名县人，1975-2015中国农业科学院北京畜牧兽医研究所从事畜牧科

学研究，研究员博士生导师；2016年至现在，北京市盖兰德科技公司名誉董事长、首席科学家，主要从事动物繁育技术和实验用小型猪近交系培育与产业化研发。

Email:fst508@sina.com

(转自《中国实验动物信息网》)

报：省民政厅、省科协、省科技厅

送：理事长、本会各位领导、常务理事、理事、会员
