

陶源,刘忠华,宋军. 基因修饰兔的发展及其在人类疾病研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 98-109, 142.
Tao Y, Liu ZH, Song J. Development of genetically modified rabbits and their applications in human disease research [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 98-109, 142.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.013

基因修饰兔的发展及其在人类疾病研究中的应用

陶 源,刘忠华,宋 军*

(东北农业大学生命科学学院,哈尔滨 150030)

【摘要】 兔是生物医学研究中的经典动物模型,由于缺乏多能干细胞(pluripotent stem cells,PSCs)和兔体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer,SCNT)技术的低效,使得兔模型的发展受到阻滞。近年来随着 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术的出现,基因修饰兔的研究取得快速发展,其在生物、医学领域所扮演的角色也越来越重要。本文归纳了兔与人类疾病模型的发展历程以及在相关疾病领域的研究,并对未来动物模型应具备的特点进行展望,旨在推动人类疾病模型兔的发展。

【关键词】 兔;人类疾病;基因修饰;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0098-12

Development of genetically modified rabbits and their applications in human disease research

TAO Yuan, LIU Zhonghua, SONG Jun*

(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

【Abstract】 The rabbit is a classical animal model in biomedical research. The development of genetically modified rabbit models has been severely impeded because of the lack of pluripotent stem cells and the extremely low efficiency of somatic cell nuclear transfer. With the rapid development of novel genome-editing techniques, such as ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9, genetic engineering of rabbits has developed rapidly. Genetically modified rabbit models are playing increasingly important roles in the field of biomedicine. In this review, we discuss the development of genetically modified rabbit models and their applications in human disease research to provide a theoretical reference for promoting the development of human disease animal models.

【Keywords】 rabbit; human diseases; genetic modification; animal model

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

人类疾病动物模型在人类疾病的研究中发挥着不可替代的作用,不同种类动物模型对我们掌握人体解剖结构、致病机制以及药物、治疗手段和工具的开发都具有十分重要的研究价值。兔作为经典的实验动物,在 19 世纪就被路易斯·巴斯德(Louis Pasteur)用来开发狂犬病疫苗。自 1900 年以来,兔一直是生产多克隆抗体的首选物种。目前,兔所产生的多克隆抗体,占实验研究和医疗使用多克隆抗体总量的 40% 以上。在 1970 年后期,人

们通过对兔的研究揭示了动脉粥样硬化的分子机制,并为他汀类药物的开发做出贡献。兔作为非啮齿类动物,它的体型介于小鼠和猪等大动物之间,相对于小鼠,其更容易操作,尤其是需反复进行的实验跟踪、操作等。在饲养管理方面,相对于猪、狗等动物模型来说,兔更容易、饲养成本也更低。此外,兔的寿命比啮齿类动物更长,种属遗传关系、免疫系统相关基因也明显比啮齿动物相关基因更接近人类。尽管,兔作为实验动物在胚胎学、免疫学、

【基金项目】 国家自然科学基金(32070540)。

【作者简介】 陶源(1998—),男,硕士研究生,研究方向:动物基因编辑与应用。E-mail: s200901014@neau.edu.cn

【通信作者】 宋军(1981—),男,博士,教授,研究方向:动物基因编辑与应用。E-mail: songjun@neau.edu.cn

心血管等研究中拥有较长的应用历史,同时胚胎移植和体外受精两项基本胚胎工程技术也是最先在兔上展开研究的。但是,目前还没有培养出具有生殖系能力的胚胎干细胞,而且兔体细胞核移植效率也相对较低,因此有关兔基因操作的相关研究进展缓慢。基因编辑随着锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs))和成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR)及相关 Cas 蛋白等基因编辑工具的出现,使得基因靶向修饰(如敲除、敲入)的效率及准确度得到了明显的提高。这些基因编辑工具的出现,推动了基因修饰动物模型的快速发展,为像兔一样既没有生殖系嵌合能力的干细胞系,同时体细胞核移植效率又极其低下的动物提供了一个有效进行精确基因修饰的途径,也为构建人类疾病动物模型提供了技术保证。

本文对基因修饰兔模型的发展以及在人类疾病研究中的重要应用进行论述,并对限制动物模型发展的因素进行归纳总结。希望对未来改善疾病模型提供理论参考,从而更好地帮助人类研究相关疾病。

1 自发性兔模型

自发性动物模型一般指的是未经人工处理,在自然条件下由基因突变而形成的异常表型,并通过遗传育种保留下来进行稳定遗传的品系^[1]。由神户大学筛选并培育的自发性动脉粥样硬化兔品系,渡边兔(Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL)是目前应用较为广泛的自发性兔人类疾病模型^[2]。渡边兔是一种自发性低密度脂蛋白受体突变而形成的内源性高胆固醇血症品系,只通过普通的饮食就能表现出动脉粥样硬化。后期,研究人员又相继培育出冠状动脉斑块与人类的纤维粥样斑块更为相似,心肌梗死率也较高的心肌梗死型渡边兔(Myocardial infarction-prone, MI rabbits)。渡边兔的出现为脂蛋白代谢以及动脉粥样硬化和冠心病的发病机制的研究做出了巨大贡献,同样也为相应的药物开发提供了帮助。Nicholls^[3]就利用渡边兔证明了低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体通路假说,并在 1985 年因胆固醇代谢调节方面的发现而获得诺贝尔奖。然而其突变基因型过于单

一,不再适合更进一步的心血管疾病研究,导致应用受限。因此神户大学于 2018 年停止了渡边兔的饲养,仅存留少量的心肌梗死型渡边兔用于研究^[4]。

同样在 1987 年发现的圣托马斯兔有着相似的自发动脉粥样硬化表型^[5],以及餐后高甘油三酯的(postprandial hypertriglyceridemic, PHT)兔等^[6]。虽然自发性兔模型能模拟相应的疾病,但兔模型种类十分有限,获得方式也不可操控,并不能很好地满足作为医学模型的需要。

2 基因修饰兔的发展历程

基因修饰主要是指利用生物化学方法修改基因序列,将目的基因片段导入宿主基因组内或者将特定的基因片段从基因组中删除,从而改变宿主基因序列^[7]。自从 Hammer 和他的同事生产了第一只基因修饰兔以来,基因修饰兔模型已经被世界各地不同的实验室用于不同的研究目的,如脂质代谢和动脉粥样硬化研究、肿瘤学、获得性免疫缺陷综合征,以及用于生产药物蛋白的生物反应器等,极大地促进了人们对于疾病治疗的研究^[8]。接下来我们将对目前生产基因修饰兔的主要技术展开讨论。

2.1 传统基因修饰兔的生产方法

1992 年,Brinster 等^[9]采用原核显微注射的方法,生产出第一只转基因兔。目前原核注射仍然是生产传统转基因动物的主要方法之一,但在兔体内转基因效率通常较低,携带目的基因的胚胎通常占注射胚胎总数 1% 左右。并且效率受到很多因素的影响,如 DNA 质量(浓度、纯度和大小)、显微注射技术人员的技能以及兔品种等^[10]。而且不能精准控制基因的拷贝数以及基因在染色体中的插入位点,直接导致不能精准调控基因的表达,并且会对其他的基因表达产生影响,甚者可能引发疾病或是癌变。随着技术的发展,研究人员后续又开发出多种基因编辑技术用于生产基因修饰兔,例如转座子、慢病毒转染等,但是这些技术只是提高了生产效率,对于精确的基因操作还无法完成。直到 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 等新型的基因编辑技术出现。目前,这些技术已经被广泛用于基因的改造并取得一定的成就^[11](表 1)。尤其是 CRISPR/Cas9 技术的出现,使得精准的基因修饰效率获得极大的提高,并将基因修饰动物的研发带入了一个高速发展的道路。为了表彰 CRISPR/Cas9 技术在基因编

辑域的突出贡献,该技术于 2020 年获得了诺贝尔化学奖。

2.2 核酸酶介导的基因修饰兔

较早出现的一类核酸酶叫作归巢核酸内切酶 (meganuclease),识别位点高达 12~40 个碱基对,具有高度的特异性,但是较大的识别位点限制了可编辑基因的范围,从而也限制了大范围应用^[22]。目前,常用的基因编辑核酸酶主要有 3 种 ZFN、TALEN 和 CRISPR。这 3 种核酸酶都能对目标基因进行编辑,尤其是 CRISPR 编辑的效率以及操作的简便程度要明显优于其他两种^[23]。人们利用核酸酶在目标位点产生 DNA 双链断裂 (double-strand Breaks, DSB),然后通过不同的修复机制来实现基因的插入或敲除^[24]。DSB 的修复方式主要包括两种,一种是非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ),这是一种错误率较高的修复方式,不需要模板,但容易形成移码突变、终止密码子提前,从而导致蛋白质编码序列的中断^[25]。而另一种则是可以通过模板进行精准修复的同源末端重组 (homology directed repair, HDR),这种修复机制可以精准地插入特定的序列,是研究基因敲入的重要方向,但与 NHEJ 途径相比,HDR 的效率较低。因此,近年来人们一直在探索增强 HDR 的调控机制^[26]。ZFN、TALEN、CRISPR 等基因编辑工具的应用促进了基

因修饰兔的发展,现如今也发展出多种利用编辑系统产生的兔人类疾病模型(表 1)。接下来我们将主要讨论这三种核酸酶在兔中的应用。

2.2.1 锌指核酸酶 (ZFNs)

由于传统的基因编辑技术准确度低、操作困难,迫使人们急需更方便准确的基因编辑方法,因此研究人员开发出一种工程核酸酶 ZFN。ZFNs 由一个 DNA 识别域以及 DNA 剪切域组成,当两个 ZFN 结合到相应的基因位点时,两个 FokI 单体相互作用形成二聚体产生酶切功能,形成断裂双链从而介导 DNA 的特定剪切^[27]。在 2011 年 ZFN 首次被 Flisikowska 等^[16]应用于兔,首次将兔的免疫球蛋白 M 基因敲除掉。虽然该技术被成功地应用于兔基因修饰,但其缺点也是显而易见的,ZFN 可识别的目标序列识别位点较少,想要制备出特异性强的 ZFN 需要进行大量的筛选工作花费大量时间^[28],从而限制了 ZFN 相关技术的发展。

2.2.2 转录激活因子样效应核酸酶 (TALENs)

2009 年,TALEN 最初被发现于黄单胞菌中,是一种分泌蛋白,可以识别特异性碱基。研究人员根据相应特性将该蛋白与核酸酶组合在一起形成了 TALENs^[29]。该系统与 ZFN 一样,被设计与 FokI 核酸酶结合来切割目标基因,但其特异性要比 ZFN 高很多^[30]。在 2013 年 TALENs 技术首次被利用敲除

表 1 基因修饰兔的重要历史节点
Table 1 The important node of genetically modified rabbit

时间 Times	方法 Method	摘要 Abstract
1985 ^[12]	原核显微注射	效率低,插入染色体的位置不固定。
	Pronucleus microinjection	The position of the low efficiency, into chromosomes are not fixed.
2002 ^[13]	体细胞核移植	首次利用卵丘细胞成功克隆兔。
	Somatic cell nuclear transfer	For the first time the cells cloned rabbit eggs hills.
2006 ^[14]	体细胞核移植	首次利用体细胞克隆出兔。
	Somatic cell nuclear transfer	For the first time using somatic cell cloned rabbit.
2010 ^[15]	慢病毒载体	嵌合体为主,传代效果差。
	Lentiviral vector	The Chimera was dominant and the generation effect was poor.
2011 ^[16]	锌指核酸酶	首次利用 ZFN 实现特定基因的敲除。
	ZFN	ZFN was used to knock out specific genes for the first time.
2013 ^[17]	转录激活因子样效应核酸酶	首次通过 TALENs 成功获得 RAG 敲除兔。
	TALEN	Rag knockout rabbits were successfully obtained by TALENs for the first time.
2014 ^[18]	转座子	首次将转座子系统利用在兔中。
	Transposon	The transposon subsystem was used in rabbit for the first time.
2014 ^[19]	成簇规律间隔短回文重复序列	首次利用 CRISPR/Cas9 系统产生基因修饰兔。
	CRISPR/Cas9	Using CRISPR/Cas9 system to generate genetically modified rabbits was the first time.
2018 ^[20]	碱基编辑	首次利用碱基编辑在兔胚胎中实现碱基的转变。
	Base editing	It is the first time to use base editing to realize base transformation in rabbit embryos.
2021 ^[21]	先导编辑	首次验证了 PE 系统介导的兔碱基插入、缺失和转化的可行性。
	Prime editing	The feasibility of the insertion, deletion and transformation of rabbit base mediated by PE system was verified for the first time.

掉兔 *RAG1* 和 *RAG2* 基因,基因敲除效率较高,*RAG1* 和 *RAG2* 分别达到 94% 和 100%^[17]。2017 年 Li 等^[31] 利用 TALEN 技术产生了赖氨酸代谢异常的赖氨酸血症兔。在 2021 年 Koike 等^[32] 通过 TALENs 在兔中敲入人 *APOAII* 基因,在高胆固醇食物的诱导下患有粥样动脉硬化的兔的比例明显降低。虽然基因编辑的效率有明显的改善,但与 ZFNs 一样,TALENs 也依赖于蛋白质与 DNA 之间的识别,因此也需要根据不同目标基因进行设计和组装,较为繁琐。

2.2.3 成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和相关 Cas 蛋白 (Cas9)

CRISPR-Cas 系统是细菌中适应性免疫系统的一部分,用于防御质粒和噬菌体的入侵^[33]。2014 年, Zhang 等^[34] 发现, CRISPR 系统中的 Cas 蛋白是一种依赖于 RNA 的 DNA 内切酶,可使得双链 DNA 特异性断裂, CRISPR 的出现极大地推动了基因编辑技术的发展,它们的出现也标志着精准基因编辑时代的开始。

CRISPR 技术于 2013 年首次应用于哺乳动物基因组,随后扩展到不同的细胞系以及哺乳动物^[35]。展现的较高的效率和精准度,并被应用于多个生物学领域^[36]。2014 年 Yang 等^[19] 首次利用该系统去产生基因修饰兔,在这项研究中,研究人员发现 CRISPR/Cas9 在兔胚胎中的敲除效率高达 100%,在兔幼崽中的效率高达 84%。

2.2.4 碱基编辑 (base editor)

在目前已知的遗传疾病中,大部分都是由于单碱基突变引起的。因此如何修复遗传疾病中的单碱基突变一直是人们的研究热点。基于此目的,在 2021 年 Huang 等^[37] 开发出不需要产生双链断裂末端 (DSB) 就可进行精准点突变的单碱基编辑系统。将改造后缺失酶切活性的 dCas9 与胞嘧啶脱氨酶结合,可将胞嘧啶转变为尿嘧啶,尿嘧啶在 DNA 复制时会转换为胸腺嘧啶,从而实现 C 到 T 的转换。2018 年 Liu 等^[20] 首次利用碱基编辑器改造兔,成功培育了包括白化病,早衰症, X-连锁扩张性心肌病等兔类型,并可以精确模拟相关疾病的发生过程。同样该课题组在 2019 年利用密码子优化的 xCas9 衍生碱基编辑器 exBE4 和 exABE 显著提高兔胚胎的碱基编辑效率^[38]。在 2022 年实现了 A-to-G 高效率转换^[39], 后续该团队相继开发出 YFE-BE4max^[40]、A3G-BEs^[41]、NG-BE4max 和 NG-

ABEmax^[42] 等碱基编辑器应用于疾病模型兔的开发,并不断提高碱基编辑的效率以及准确度。

2.2.5 先导编辑 (Prime editor)

在 2019 年, Anzalone 等^[43] 开发出一种全新的精准的基因编辑工具 Prime editor (PE)。该工具将 nCas9 (Nickase cas9) 与工程化改造的逆转录酶融合构成效应蛋白;其次将 sgRNA (small guide RNA)、引物结合位点和储存有靶向位点编辑信息的反转录模板融合,形成 pegRNA (Prime Editing Guide RNA)。pegRNA 具有双重功能,既能够将编辑蛋白引导到目标位点,又含有编辑的模板序列。在 nCas9 切割目标位点之后,逆转录酶以 pegRNA 作为模板进行逆转录,然后将切口修复。PE 系统不仅不需要产生 DSB,还能够实现任意方式的碱基替换,小片段的插入、缺失。日前, Qian 等^[21] 就首次利用 PE 编辑系统应用于兔,验证了 PE 系统介导的碱基插入、缺失和转化的可行性。截至目前,利用 CRISPR 系统产生的人类疾病模型兔已经多达几十种,涉及多种人类疾病,极大地促进了相关研究的发展,提高了兔在人类疾病研究中的重要地位,为不同的疾病研究以及药物开发带来了新的希望^[44]。虽然这些改进的编辑系统在编辑效率、精准度上有所提升,却仍存在操作繁琐、递送效率低、脱靶情况不明确等问题^[45],但不可否认的是编辑工具的更新推动了基因修饰的发展,也为如何安全地利用基因编辑工具提供了新的思路。

3 基因修饰兔在人类医学中的应用

3.1 兔在人类医学中具有的优势

小鼠等啮齿类动物和兔等实验动物,长期在人类疾病的研究中被使用,以提高我们对人类疾病生理、病理变化的认知。因此,能否准确地模拟人类疾病的发生发展过程是判断在医学动物模型优劣的重要前提。兔除了在体型、繁殖等方面的优势,在一些人类疾病的研究中也具有独特的优势。例如,兔与人在免疫系统发育程度上相似程度明显高于其他啮齿动物,因此在艾滋病 (human immunodeficiency virus, HIV)、人乳头状瘤病毒 (human papilloma virus, HPV)、黏液瘤病毒 (myxoma virus, MYXV)、红斑狼疮等免疫相关疾病方面扮演着重要的角色作用^[46]。在生理和组织结构方面,兔也与人类具有极强的相似性,例如成年兔子的腹主动脉和胸主动脉与成人冠状动脉相当。

此外,兔在脂代谢情况、低密度脂蛋白含量、眼部结构、性成熟后的骺板闭合等特征都与人类高度相似,使得兔成为心血管疾病、高血脂、眼部疾病、骨质疏松等疾病研究的重要实验对象^[47]。

3.2 基因修饰兔与人类疾病

近几年随着基因编辑技术的快速发展,人类疾病模型兔的种类也在逐渐增多,并被应用于多种疾病(表 2),接下来我们将对其中几种较为重要的疾病模型展开讨论。

3.2.1 心血管疾病

在目前所有种类的动物模型中,兔是第一个用于研究脂蛋白代谢和动脉粥样硬化的动物模型。由于野生型兔在高胆固醇食物喂养时很容易产生高脂血症,并迅速发展成主动脉和冠状动脉粥样硬化。因此,兔被广泛用于研究人类脂质代谢和相关

心血管疾病,包括动脉粥样硬化。1908 年,俄罗斯医生用添加动物蛋白的饲料喂养兔,首次发现这些兔出现明显的主动脉粥样硬化。自此展开了利用兔作为动物模型来研究心血管疾病的历史^[63]。

2013 年 Yang 等^[64]通过 TALEN 生产出载脂蛋白 C3 (apolipoprotein C3, ApoCIII) 基因敲除的兔。在最近的研究中发现 *ApoCIII* 基因缺失会显著提高肝脏分解富含甘油三酯的脂蛋白的能力,同时, *ApoCIII* 基因缺失兔也不具有明显的高脂血症以及动脉粥样硬化的症状^[65]。2017 年 Zhang 等^[66]人产生了胆固醇酯转移蛋白 (cholesterol ester transfer protein, *CETP*) 敲除兔,发现 *CETP* 敲除兔的血浆中高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 胆固醇水平降低。并且当喂食高胆固醇饮食时, *CETP* 敲除兔仍然表现出比野生型 (Wild type, WT) 兔更低

表 2 其他人类疾病基因修饰兔模型
Table 2 Other human disease genetically modified rabbit model

疾病 Diseases	相关基因 Related gene	症状 Symptom
肥厚型心肌病 ^[48-50] HCM	<i>β-MHC-Q403</i>	早发性心律失常, 心肌肥大 Premature arrhythmia, cardiac hypertrophy
	<i>TnI</i>	无明显症状 No obvious symptoms
	<i>M149V ELC1v</i>	无明显症状 No obvious symptoms
		QT 间期延长 QT interval is prolonged
QT 间期延长综合征 1 ^[51] LQT1	<i>KCNQ1/KvLQT1-Y315S</i>	长 QT 间期综合征、心律失常、心源性猝死风险增加 Long QT syndrome, arrhythmias, and sudden cardiac death are at increased risk
QT 间期延长综合征 2 ^[51] LQT2	<i>KCNH2/HERG-G628S</i>	药物性心律失常增加 Drug-induced arrhythmias increase
QT 间期延长综合征 5 ^[52] LQT5	<i>KCNE1-G52R</i>	QT/APD 增加 QT/APD increases
QT 间期延长综合征 2-5 ^[52] LQT2-5	<i>KCNH2/HERG-G628S, KCNE1-G52R</i>	心房颤动、心源性猝死风险增加 The risk of atrial fibrillation and sudden cardiac death is increased
短 QT 间期综合征 ^[53] SQT1	<i>KCNH2/HERG-N588K</i>	T 和 B 细胞功能丧失、胸腺发育不全, 免疫功能缺失 T and B cell function loss, thymus hypoplasia, immune function loss
免疫缺陷 ^[54-55] Immunodeficiency	<i>FOXN1, PRKDC, RAG1, RAG2, IL2RG, IgH</i>	自发性细菌感染、肠梗阻 Spontaneous bacterial infection and intestinal obstruction
囊性纤维化 ^[56] Cystic fibrosis	<i>CFTR</i>	肌肉坏死、纤维化 Muscle necrosis and fibrosis
肌肉发育不良 ^[57] Muscular dysplasia	<i>ANO5</i>	心肌病、肌肉萎缩、骨关节异常 Cardiomyopathy, muscle atrophy, bone and joint abnormalities
早衰综合征 ^[58] Premature aging syndrome	<i>LMNA</i>	早衰 Premature senility
沃纳综合征 ^[59] Werner's syndrome	<i>WRN</i>	铜离子代谢异常 Abnormal metabolism of copper ions
威尔逊病 ^[60] Wilson's disease	<i>ATP7B</i>	肝血管瘤、肾功能不全 Hepatic hemangioma and renal insufficiency
Kasabach-Merritt 综合征 ^[61] Kasabach-Merritt syndrome	<i>VEGF</i>	皮肤呈鱼鳞状, 较粗糙, 容易溃烂 The skin is fish scale shape, coarser, easy canker
鳞状细胞瘤 ^[62] Squamous cell carcinoma	<i>EJras</i>	

的 HDL 胆固醇水平。同时 CETP 敲除兔冠状动脉的狭窄程度也明显优于 WT 兔。2018 年 Lu 等^[67]利用 CRISPR/Cas9, 培育出低密度脂蛋白受体敲除兔, 并发现纯合子 LDL 受体敲除兔与人类的高胆固醇血症相似, 会出现自发性高胆固醇血症以及动脉粥样硬化。同样 Koike 等^[32]将载脂蛋白 A2 (Apolipoprotein A2, *ApoAII*) 敲入到兔中, 发现兔血液中出现低甘油三酯以及较高的高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇的现象, 并且在高胆固醇饮食的喂养下, 该兔动脉粥样硬化情况也要明显优于普通的兔。目前已经发展出几十种表达与脂质代谢和动脉粥样硬化有关的基因修饰兔 (表 3)

3.2.2 眼科疾病

虽然传统的眼睛结构、光学系统的研究是在啮齿类动物上完成的, 但这些动物一般不适合进行临床以及药物安全性的研究。相对于啮齿类的小鼠、大鼠来说, 兔的眼球体积较大, 并且与人类有着相似的眼部结构、光学系统和生理特性。此外, 兔视网膜的血管较浅, 也更适合药物注射^[90]。综合上述特征, 兔是一种非常适合作为研究眼部疾病的动物模型。

目前, 兔已经被用作包括干眼症、青光眼、老年性黄斑变性、视网膜病变、白内障和葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变等在内的主要眼科疾病的临床、解剖学病理学以及药物代谢等研究。然而大部分用于研究的兔都是通过手术或者药物注射等方法生产出来的, 由于基因编辑技术的限制, 人们只能通过模拟病理状态来达到研究目的, 而不能通过基因层面来准确研究致病机理^[91]。直到 2009 年 Kondo 等^[92]首次利用 BAC 技术成功地在兔紫红质基因 P347L 引入点突变。成功培育出具有明显色素性视网膜病变临床症状的转基因兔模型。Chentoufi 等^[93]首次将人源化的人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 转基因兔应用于开发预防原发性眼部疱疹感染和治疗该疾病的疫苗中^[94]。2016 年 Yuan 等^[95]将 Cas9/sgRNA mRNA 共注射到兔受精卵中, 开发了具有 *GJA8* 基因敲除的白内障模型。结果表明, *GJA8* 基因座的基因突变效率在胚胎中达到 98.7%, 在幼崽中达到 100%, 并且具有明显的白内障的临床症状。同样该团队在 2017 年将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 共注射到受精卵中产生了先天性白内障形状的 α A-晶状体蛋白基因敲除兔^[96]。Lee 等^[97]使用 CRISPR/Cas9 系统抑制结缔组织生长因

子的表达, 成功地阻滞青光眼滤过手术过程中眼组织的纤维化。近几年随着兔模型的开发与应用, 治疗眼科疾病的药物以及实验数据也在逐年丰富^[98]。然而, 正如上文所述在目前眼科疾病方面兔模型主要围绕生理特征、解剖结构以及药物实验等以实验方法诱导的研究为主。基因修饰兔模型还是处于一个起步阶段, 随着基因编辑技术不断的发展, 在眼科疾病治疗方面基因修饰兔还是具有广阔的发展前景。

3.2.3 艾滋病病毒 (HIV)

导致艾滋病的病毒 HIV-1 和 HIV-2 统称为灵长类慢病毒。该病毒可轻易地感染人类, 并在 CD4⁺ T 细胞和巨噬细胞中复制。在缺乏治疗的情况下, 病毒入侵会导致 CD4⁺ T 细胞等一系列免疫细胞功能缺失, 最终导致严重的免疫缺陷, 进而威胁生命。小鼠和大鼠是最常用于建立艾滋病模型的动物, 但由于人和小鼠细胞上的 CD4⁺ 分子序列有差异导致 HIV-1 病毒并不能在小鼠细胞中复制存活。并且在后续研究中发现小鼠与人类存在 TRIM5、APOBEC3、Tetherin、SAMHD1 等一系列限制因子间的差异, 这种巨大的物种特异性, 导致该病毒在人类以外的宿主上很难复制存活^[99]。小鼠和大鼠等啮齿类动物被认为是不会感染艾滋病毒的。一篇早期综述文章中将兔子、黑猩猩和长臂猿列为易感染 HIV-1 的动物物种, 虽然非人类灵长类动物被认为是最适合作为模拟该疾病的动物, 在多个生理方面与人类高度相似, 然而相关物种数量稀缺, 价格昂贵^[100]。使得利用非人类灵长类来研究艾滋病特征受到极大限制。因此利用兔研究艾滋病受到人们的青睐^[101]。在 1995 年 Dunn 等^[102]就报道了成功将人类 CD4⁺ 在兔细胞上成功表达。在 2018 年 Esteves 等^[103]就对大鼠、小鼠、兔这 3 个物种间的分子障碍进行了研究, 并表明相对于其它物种, 兔的分子屏障更少, 主要分为 CD4⁺ T 细胞介导的、TRIM5 介导的逆转录屏障和巨噬细胞介导的病毒粒子屏障。并且成功的培育出 *hCD4/hCCR5* 双转基因兔, 在兔细胞中实现了 HIV-1 的包膜特异性和共受体依赖性进入。目前, CD4⁺ T 细胞介导的、TRIM5 介导的逆转录屏障两种障碍已经通过基因改造得到解决, 可以肯定的是随着相关基因编辑技术的改进, 兔会成为一种良好的艾滋病模型, 在相应的疾病预防及治疗起到积极的作用。

表 3 基因修饰兔与心血管疾病研究
Table 3 Genetically modified rabbits and cardiovascular disease research

基因 Gene	修饰类型 Type specifier	表达细胞或部位 Expression cell or site	表型 Phenotype
载脂蛋白 A ^[68] <i>ApoA</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
载脂蛋白 A1 ^[69] <i>ApoA-I</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化症状减轻 Less arteriosclerosis
载脂蛋白 A2 ^[70] <i>ApoA-II</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化症状减轻 Less arteriosclerosis
载脂蛋白 B-100 ^[71] <i>ApoB-100</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	LDL 升高, HDL 降低 LDL rises, HDL falls
载脂蛋白 C3 ^[72] <i>ApoCIII</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	VLDL 升高 VLDL rises
载脂蛋白 C3 ^[73] <i>ApoCIII</i>	基因敲除 Gene knock-out	全身 All over	VLDL 和 IDL 降低, 主动脉和冠状动脉粥样硬化均明显减少 VLDL and IDL were decreased, and aortic and coronary atherosclerosis were significantly reduced.
载脂蛋白 C1 ^[74] <i>ApoC1</i>	基因敲入 Gene knock-in	全身 All over	HDL 升高, 动脉粥样硬化减少 HDL is up, arteriosclerosis is down
载脂蛋白 E2 ^[75] <i>ApoE2</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
载脂蛋白 E3 ^[76] <i>ApoE3</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
肝脂肪酶 ^[77] <i>Hepatic lipase</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化症状减轻 Less arteriosclerosis
内皮脂肪酶 ^[78] <i>Endothelial lipase</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
ApoB mRNA 编辑蛋白 C1 ^[79] <i>APOPEC1</i>	基因敲低 Gene knock-down	全身 All over	营养不良 Malnutrition
ApoB mRNA 编辑蛋白 C1 ^[80] <i>APOPEC1</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	LDL 降低 LDL falls
胆固醇酰基转移酶 ^[81] <i>LCAT</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	动脉粥样硬化症状减轻 Less arteriosclerosis
血浆磷脂转移蛋白 ^[82] <i>PLTP</i>	基因敲入 Gene knock-in	全身 All over	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
胆固醇酯转移蛋白 ^[83] <i>CETP</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	HDL 降低 HDL falls
脂蛋白酯酶 ^[84] <i>Lipoprotein lipase</i>	基因敲入 Gene knock-in	全身 All over	动脉粥样硬化症状减轻 Less arteriosclerosis
基质金属蛋白酶 9 ^[85] <i>MMP-9</i>	基因敲入 Gene knock-in	巨噬细胞 Macrophage	血管钙化 Vascular calcification
基质金属蛋白酶 12 ^[86] <i>MMP-12</i>	基因敲入 Gene knock-in	巨噬细胞 Macrophage	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
血管内皮生长因子 ^[61] <i>VEGF</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	肾小球功能受损 Impaired glomerular function
C 反应蛋白 ^[87] <i>C-reactive</i>	基因敲入 Gene knock-in	肝 Liver	形成血栓 Thrombose
尾加压素 2 ^[88] <i>Urotensin II</i>	基因敲入 Gene knock-in	巨噬细胞 Macrophage	动脉粥样硬化 Arteriosclerosis
15-脂氧化酶 ^[89] <i>15-lipoxygenase</i>	基因敲入 Gene knock-in	巨噬细胞 Macrophage	动脉粥样硬化症状减轻 Less arteriosclerosis

3.2.4 人乳头状瘤病毒(HPV)

HPV 是一种球形 DNA 病毒,基因全长约 8 kb,能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖。是影响中年妇女的主要公共卫生问题。尽管在过去几十年中宫颈癌的检测和预防有了显著改善,但生殖器癌症仍然难治疗。当前 HPV 相关癌症临床试验侧重于为所有 HPV 相关癌症寻找合适的检测方法以及相关预防疫苗的开发^[104]。因此也需要一个有效的模型来替代人类,兔长期以来一直是研究 HPV 发病机制及其相关疾病和癌症的金标准模型,棉尾兔乳头状瘤病毒(Cottontail rabbit papillomavirus, CRPV)和兔口腔乳头状瘤病毒(rabbit oral papillomavirus, ROPV)感染^[105],其中棉尾兔乳头状瘤病毒(CRPV)是第一个被证明具有致癌性的 HPV 相关 DNA 病毒,并且也是研究最为全面的。棉尾兔模型作为高危人乳头状瘤病毒(HPV)感染模型建立以来,被广泛应用于 HPV 病毒与宿主间相互作用的研究,并在多种预防性疫苗的研制中发挥了关键作用^[106]。早在 20 世纪 90 年代就有人利用棉尾兔乳头状瘤病毒(CRPV)转基因的兔研究该基因在兔体内组织特异性表达的机制^[107],首次证明乳头状瘤病毒的组织特异性表达与 DNA 甲基化相关。在 2001 年 Peng 等^[108]利用 CRPV 去感染携带 EJras 致癌基因的转基因兔,表明 CRPV 感染后能够重新启动转基因兔携带的 CRP 控制的 EJras 癌基因的表达,并且 EJras 的表达也可以增强 CRPV 肿瘤的发

生。在 2006 年 Hu 等^[109]建立了人类 MHC-I(HLA-A2.1)转基因兔研究病毒感染期间的 CD8⁺ T 细胞反应。Hu 等^[110]利用计算机算法从感染 HPV 的兔模型中筛选和识别出多个 HPV 相关基因。进一步研究发现,包括 APOBEC2 和 IL36 γ 在内的几个免疫相关基因在持续性 HPV 肿瘤中存在明显的失调,这与 HPV 相关癌症的特征一致。鉴于这些发现, APOBEC2 和 IL36 γ 基因敲除兔将有助于阐明这两个基因是否在 HPV 相关疾病研究中发挥关键作用。这些兔模型一旦建立,不仅有助于 CRPV 兔模型整合到人类转化研究中,还将支持 HPV 癌症治疗新诊断和治疗靶点的验证。

4 兔疾病模型与人类疾病间发展瓶颈

实验动物是供生物医学实验研究使用的动物,而在生物医学研究中大多数实验动物模型是针对人类疾病发生、发展、治疗而言的^[111]。然而实验动物模型是否真的能完全模拟人类疾病的发病机制?这仍然需要大量的试验去验证^[112]。没有任何一种模型可以涉及广泛研究领域^[113];包括兔疾病模型也存在异种移植时会产生明显的排斥反应以及并发症;缺乏淋巴 B 细胞免疫球蛋白反应,导致人类免疫功能不全;人类肠道淋巴组织细胞重建效果差,淋巴组织发育不全;人类以及模型之间各种代谢水平不同步;寿命过短等一系列问题^[114]。因此如何让基因修饰兔能更好地去模拟人类,是目前主

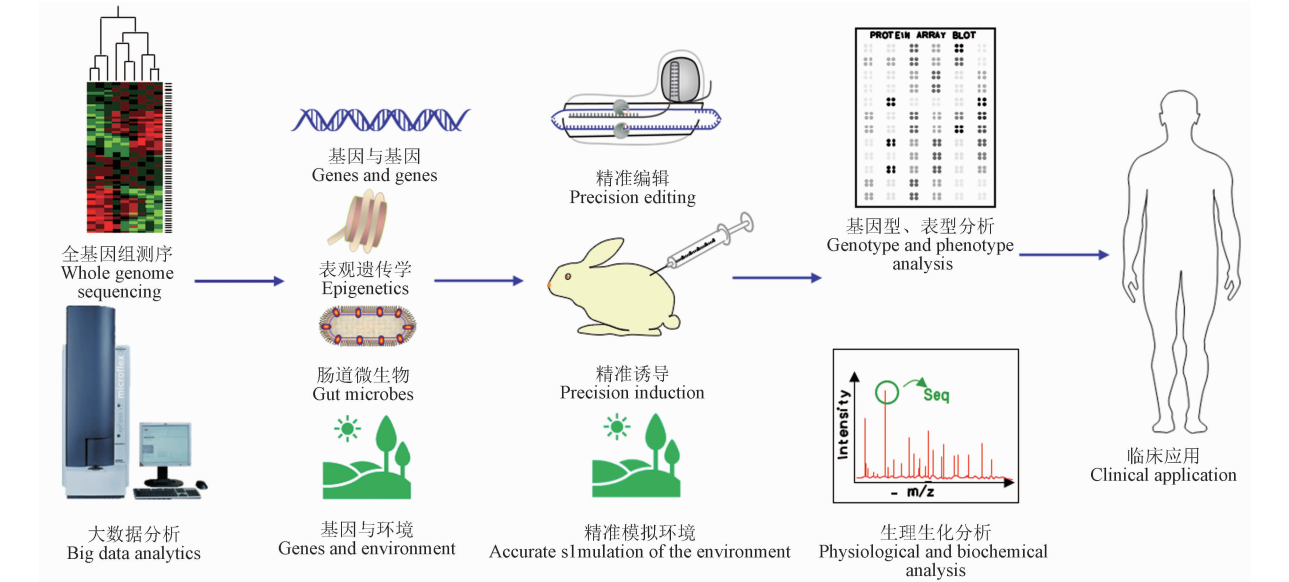


图 1 理想兔疾病模型所具备的特点

Figure 1 The characteristics of an ideal rabbit model of human disease

要存在的问题。得益于大数据的发展,人类的疾病迎来了全基因组时代,人类疾病的研究不再局限于相关性状,以及单个基因的研究,而是基因与基因、基因与环境间的相互作用^[115]。特别是近些年来在表观遗传学^[116]、人类微生物群及人类宏基因组^[117]、人类与环境等方面的数据挖掘,使得人们能进一步了解疾病的发病机制^[118]。兔,因其高繁殖性能更适用于基因修饰研究,所以基因编辑技术的进步极大地推进了兔疾病模型的发展,目前基于 CRISPR/Cas9 开发出的兔疾病模型已经在多种疾病领域展开应用,同时,研究人员不断地改进基因编辑工具使得修饰的精准度以及效率都有明显的提升,从而让研究人员不仅可以发现基因,更可以改变基因。这些进步都将弥补其他动物模型(如小鼠、大鼠、猪和猴子)存在的不足^[119]。最后,我们希望在未来建立一套完整的生产兔疾病模型的流程如(图 1),在大数据的时代背景下,掌握不同物种间的细微差异,并从表观遗传、肠道微生物、基因与基因、基因与环境等多方面确定真实的致病原因。精确地对兔进行改造、正确分析实验结果、评估动物模型的整体情况,最终投入生物医学实验研究。

5 结语

在这篇综述中我们阐述了兔疾病模型的发展,以及相关基因编辑技术在兔上的应用,并介绍了几种相关的兔人类疾病模型的应用,虽然 CRISPR/Cas9 的出现给兔疾病模型带来很大改变。但是,正如文章中说到目前还没有一个十分完美的模型可以完全模拟人类疾病,因此如何使疾病模型兔更好地模拟人类疾病发病机制是未来的一个重要研究方向。

参考文献:

- [1] 张连峰,崔韶. 国内外实验动物模型概览 [J]. 科技导报, 2017, 35(24): 27-31.
- [2] Shiomi M. The history of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia (I)-contribution to the elucidation of the pathophysiology of human hypercholesterolemia and coronary heart disease [J]. J Atheroscler Thromb, 2020, 27(2): 105-118.
- [3] Nicholls M. Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein [J]. Eur Heart J, 2019, 40(42): 3447-3449.
- [4] Shiomi M. The history of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia (II)-contribution to the development and validation of the therapeutics for hypercholesterolemia and atherosclerosis [J]. J Atheroscler Thromb, 2020, 27(2): 119-131.
- [5] La Ville A, Turner PR, Pittilo RM, et al. Hereditary hyperlipidemia in the rabbit due to overproduction of lipoproteins. I. Biochemical studies [J]. Arteriosclerosis, 1987, 7(2): 105-112.
- [6] Kawai T, Ito T, Ohwada K, et al. Hereditary postprandial hypertriglyceridemic rabbit exhibits insulin resistance and central obesity: a novel model of metabolic syndrome [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(12): 2752-2757.
- [7] Banan M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells [J]. J Biotechnol, 2020, 308: 1-9.
- [8] Yang D, Xu J, Chen YE. Generation of rabbit models by gene editing nucleases [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1874: 327-345.
- [9] Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, et al. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs [J]. Biotechnology, 1992, 24: 411-419.
- [10] Bösze Z, Major P, Baczkó I, et al. The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2016, 121(2): 123-130.
- [11] Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease [J]. J Pathol, 2016, 238(2): 166-179.
- [12] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection [J]. Nature, 1985, 315(6021): 680-683.
- [13] Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(4): 366-369.
- [14] Li S, Chen X, Fang Z, et al. Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer [J]. Reproduction, 2006, 131(6): 1085-1090.
- [15] Hiripi L, Negre D, Cosset FL, et al. Transgenic rabbit production with Simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector [J]. Transgenic Res, 2010, 19(5): 799-808.
- [16] Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21045.
- [17] Song J, Zhong J, Guo X, et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs [J]. Cell Res, 2013, 23(8): 1059-1062.
- [18] Ivics Z, Hiripi L, Hoffmann OI, et al. Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of sleeping beauty transposons [J]. Nat Protoc, 2014, 9(4): 794-809.
- [19] Yang D, Xu J, Zhu T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases [J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(1): 97-99.
- [20] Liu Z, Chen M, Chen S, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2717.
- [21] Qian Y, Zhao D, Sui T, et al. Efficient and precise generation of

- Tay-Sachs disease model in rabbit by prime editing system [J]. *Cell Discov*, 2021, 7(1): 50.
- [22] Suzuki S, Ohta KI, Nakajima Y, et al. Meganuclease-based artificial transcription factors [J]. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(10): 2679–2691.
- [23] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various aspects of a gene editing system-CRISPR-Cas9 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9604.
- [24] Smirnikhina SA, Anuchina AA, Lavrov AV. Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies [J]. *Hum Genet*, 2019, 138(1): 1–19.
- [25] Xu Y, Xu D. Repair pathway choice for double-strand breaks [J]. *Essays Biochem*, 2020, 64(5): 765–777.
- [26] Yeh CD, Richardson CD, Corn JE. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(12): 1468–1478.
- [27] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773–782.
- [28] Broeders M, Herrero-Hernandez P, Ernst MPT, et al. Sharpening the molecular scissors: advances in gene-editing technology [J]. *iScience*, 2020, 23(1): 100789.
- [29] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512.
- [30] Hayat S, Khan SH. Genome-editing technologies: concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 326–334.
- [31] Li L, Zhang Q, Yang H, et al. Fumarylacetoacetate hydrolase knock-out rabbit model for hereditary tyrosinemia type 1 [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(11): 4755–4763.
- [32] Koike T, Koike Y, Yang D, et al. Human apolipoprotein A-II reduces atherosclerosis in knock-in rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 316: 32–40.
- [33] Yang Y, Huang Y. The CRISPR/Cas gene-editing system-an immature but useful toolkit for experimental and clinical medicine [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2(1): 5–8.
- [34] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(R1): R40–R46.
- [35] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [36] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various aspects of a gene editing system-CRISPR-Cas9 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9604.
- [37] Huang TP, Newby GA, Liu DR. Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(2): 1089–1128.
- [38] Liu Z, Chen M, Shan H, et al. Expanded targeting scope and enhanced base editing efficiency in rabbit using optimized xCas9 (3.7) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(20): 4155–4164.
- [39] Zhao D, Qian Y, Li J, et al. Highly efficient A-to-G base editing by ABE8.17 in rabbits [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 27: 1156–1163.
- [40] Liu Z, Chen S, Shan H, et al. Efficient base editing with high precision in rabbits using YFE-BE4max [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 36.
- [41] Liu Z, Chen S, Shan H, et al. Precise base editing with CC context-specificity using engineered human APOBEC3G-nCas9 fusions [J]. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 111.
- [42] Liu Z, Shan H, Chen S, et al. Highly efficient base editing with expanded targeting scope using SpCas9-NG in rabbits [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 588–596.
- [43] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149–157.
- [44] Song J, Zhang J, Xu J, et al. Genome engineering technologies in rabbits [J]. *J Biomed Res*, 2020, 35(2): 135–147.
- [45] Li G, Li X, Zhuang S, et al. Gene editing and its applications in biomedicine [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(4): 660–700.
- [46] Xu J, Zhang J, Yang D, et al. Gene editing in rabbits: unique opportunities for translational biomedical research [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 642444.
- [47] Mage RG, Esteves PJ, Rader C. Rabbit models of human diseases for diagnostics and therapeutics development [J]. *Dev Comp Immunol*, 2019, 92: 99–104.
- [48] Lombardi R, Rodriguez G, Chen SN, et al. Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms [J]. *Circulation*, 2009, 119(10): 1398–1407.
- [49] Sanbe A, James J, Tuzcu V, et al. Transgenic rabbit model for human troponin I-based hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2005, 111(18): 2330–2338.
- [50] Xu X, Salata JJ, Wang J, et al. Increasing I(Ks) corrects abnormal repolarization in rabbit models of acquired LQT2 and ventricular hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(2): H664–H670.
- [51] Lang CN, Koren G, Odening KE. Transgenic rabbit models to investigate the cardiac ion channel disease long QT syndrome [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2016, 121(2): 142–156.
- [52] Hornyik T, Castiglione A, Franke G, et al. Transgenic LQT2, LQT5, and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarisation reserve for prediction of drug-induced ventricular arrhythmias [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(16): 3744–3759.
- [53] Odening KE, Bodi I, Franke G, et al. Transgenic short-QT syndrome 1 rabbits mimic the human disease phenotype with QT/action potential duration shortening in the atria and ventricles and increased ventricular tachycardia/ventricular fibrillation inducibility [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(10): 842–853.
- [54] Song J, Wang G, Hoenerhoff MJ, et al. Bacterial and *Pneumocystis* infections in the lungs of gene-knockout rabbits with severe combined immunodeficiency [J]. *Front Immunol*,

- 2018, 9: 429.
- [55] Jasper PJ, Rhee KJ, Kalis SL, et al. B lymphocyte deficiency in IgH-transgenic rabbits [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(8): 2290–2299.
 - [56] Xu J, Livraghi-Butrico A, Hou X, et al. Phenotypes of CF rabbits generated by CRISPR/Cas9-mediated disruption of the CFTR gene [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(1): e139813.
 - [57] Sui T, Xu L, Lau YS, et al. Development of muscular dystrophy in a CRISPR-engineered mutant rabbit model with frame-disrupting ANO5 mutations [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 609.
 - [58] Sui T, Liu D, Liu T, et al. LMNA-mutated rabbits; a model of premature aging syndrome with muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(1): 102–115.
 - [59] Wu H, Liu Q, Shi H, et al. Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes genome editing capability in mammalian systems [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(19): 3593–3607.
 - [60] Jiang W, Liu L, Chang Q, et al. Production of Wilson disease model rabbits with homology-directed precision point mutations in the ATP7B gene using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1332.
 - [61] Kitajima S, Liu E, Morimoto M, et al. Transgenic rabbits with increased VEGF expression develop hemangiomas in the liver; a new model for Kasabach-Merritt syndrome [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(12): 1517–1527.
 - [62] Peng X, Griffith JW, Han R, et al. Development of keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in transgenic rabbits with targeted expression of EJras oncogene in epidermis [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(1): 315–324.
 - [63] Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146: 104–119.
 - [64] Yang D, Zhang J, Xu J, et al. Production of apolipoprotein C-III knockout rabbits using zinc finger nucleases [J]. *J Vis Exp*, 2013, 81: e50957.
 - [65] Zha Y, Lu Y, Zhang T, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of APOC3 stabilizes plasma lipids and inhibits atherosclerosis in rabbits [J]. *Lipids Health Dis*, 2021, 20(1): 180.
 - [66] Zhang J, Niimi M, Yang D, et al. Deficiency of cholesteryl ester transfer protein protects against atherosclerosis in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(6): 1068–1075.
 - [67] Lu R, Yuan T, Wang Y, et al. Spontaneous severe hypercholesterolemia and atherosclerosis lesions in rabbits with deficiency of low-density lipoprotein receptor (LDLR) on exon 7 [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 29–38.
 - [68] Rouy D, Duverger N, Lin SD, et al. Apolipoprotein(a) yeast artificial chromosome transgenic rabbits. Lipoprotein (a) assembly with human and rabbit apolipoprotein B [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(2): 1247–1251.
 - [69] Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, et al. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits [J]. *Circulation*, 1996, 94(4): 713–717.
 - [70] Wang Y, Niimi M, Nishijima K, et al. Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): 224–231.
 - [71] Fan J, McCormick SP, Krauss RM, et al. Overexpression of human apolipoprotein B-100 in transgenic rabbits results in increased levels of LDL and decreased levels of HDL [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(11): 1889–1899.
 - [72] Ding Y, Wang Y, Zhu H, et al. Hypertriglyceridemia and delayed clearance of fat load in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein CIII [J]. *Transgenic Res*, 2011, 20(4): 867–875.
 - [73] Yan H, Niimi M, Matsuhisa F, et al. Apolipoprotein CIII deficiency protects against atherosclerosis in knockout rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(9): 2095–2107.
 - [74] Gautier T, Deckert V, Aires V, et al. Human apolipoprotein C1 transgenesis reduces atherogenesis in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 320: 10–18.
 - [75] Huang Y, Schwendner SW, Rall SC Jr, et al. Apolipoprotein E2 transgenic rabbits. Modulation of the type III hyperlipoproteinemic phenotype by estrogen and occurrence of spontaneous atherosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(36): 22685–22694.
 - [76] Huang Y, Ji ZS, Brecht WJ, et al. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic VLDL production and impairing VLDL lipolysis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(12): 2952–2959.
 - [77] Fan J, Wang J, Bensadoun A, et al. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(18): 8724–8728.
 - [78] Wang C, Nishijima K, Kitajima S, et al. Increased hepatic expression of endothelial lipase inhibits cholesterol diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in transgenic rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(7): 1282–1289.
 - [79] Jolivet G, Braud S, DaSilva B, et al. Induction of body weight loss through RNAi-knockdown of APOBEC1 gene expression in transgenic rabbits [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106655.
 - [80] Yamanaka S, Balestra ME, Ferrell LD, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(18): 8483–8487.
 - [81] Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Bérard AM, et al. Overexpression of lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(21): 11448–11453.
 - [82] Masson D, Deckert V, Gautier T, et al. Worsening of diet-

- induced atherosclerosis in a new model of transgenic rabbit expressing the human plasma phospholipid transfer protein [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(4): 766-774.
- [83] Gao S, Wang X, Cheng D, et al. Overexpression of cholesteryl ester transfer protein increases macrophage-derived foam cell accumulation in atherosclerotic lesions of transgenic rabbits [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3824276.
- [84] Fan J, Shimoyamada H, Sun H, et al. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(1): 88-94.
- [85] Chen Y, Waqar AB, Nishijima K, et al. Macrophage-derived MMP-9 enhances the progression of atherosclerotic lesions and vascular calcification in transgenic rabbits [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7): 4261-4274.
- [86] Liang J, Liu E, Yu Y, et al. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits [J]. *Circulation*, 2006, 113(16): 1993-2001.
- [87] Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, et al. Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(1): 201-208.
- [88] Zhao S, Li Y, Gao S, et al. Autocrine human urotensin II enhances macrophage-derived foam cell formation in transgenic rabbits [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 843959.
- [89] Shen J, Herderick E, Cornhill JF, et al. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(10): 2201-2208.
- [90] Assi L, Rosman L, Chamseddine F, et al. Eye health and quality of life: an umbrella review protocol [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(8): e037648.
- [91] Singh S, Sharma S, Basu S. Rabbit models of dry eye disease: current understanding and unmet needs for translational research [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 206: 108538.
- [92] Kondo M, Sakai, Komeima K, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(3): 1371-1377.
- [93] Chentoufi AA, Dasgupta G, Christensen ND, et al. A novel HLA (HLA-A * 0201) transgenic rabbit model for preclinical evaluation of human CD8⁺ T cell epitope-based vaccines against ocular herpes [J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2561-2571.
- [94] Wang Y, Zhao L, Lu F, et al. Retinoprotective effects of bilberry anthocyanins via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms in a visible light-induced retinal degeneration model in pigmented rabbits [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 22395-22410.
- [95] Yuan L, Sui T, Chen M, et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22024.
- [96] Yuan L, Yao H, Xu Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of α A-crystallin gene induces congenital cataracts in rabbits [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(6): BIO34-BIO41.
- [97] Lee EJ, Han JC, Park DY, et al. Effect of connective tissue growth factor gene editing using adeno-associated virus-mediated CRISPR-Cas9 on rabbit glaucoma filtering surgery outcomes [J]. *Gene Ther*, 2021, 28(5): 277-286.
- [98] Mischiati C, Feriotto G, Tabolacci C, et al. Polyamine oxidase is involved in spermidine reduction of transglutaminase type 2-catalyzed β H-crystallins polymerization in calcium-induced experimental cataract [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5427.
- [99] Ganser-Pornillos BK, Pornillos O. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(9): 546-556.
- [100] Xiao Q, Guo D, Chen S. Application of CRISPR/Cas9-based gene editing in HIV-1/AIDS therapy [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 69.
- [101] Reeves DB, Rolland M, Dearlove BL, et al. Timing HIV infection with a simple and accurate population viral dynamics model [J]. *J R Soc Interface*, 2021, 18(179): 20210314.
- [102] Dunn CS, Mehtali M, Houdebine LM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4-transgenic rabbits [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt 6): 1327-1336.
- [103] Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf HM, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(5): 1-10.
- [104] Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17(4): 864-878.
- [105] Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression [J]. *Virology*, 2011, 414(2): 153-163.
- [106] Cladel NM, Peng X, Christensen N, et al. The rabbit papillomavirus model: a valuable tool to study viral-host interactions [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2019, 374(1773): 20180294.
- [107] Peng X, Lang CM, Kreider JW. Methylation of cottontail rabbit papillomavirus DNA and tissue-specific expression in transgenic rabbits [J]. *Virus Res*, 1995, 35(1): 101-108.
- [108] Peng X, Griffith JW, Lang CM. Reinitiated expression of EJras transgene in targeted epidermal cells of transgenic rabbits by cottontail rabbit papillomavirus infection [J]. *Cancer Lett*, 2001, 171(2): 193-200.
- [109] Hu J, Peng X, Schell TD, et al. An HLA-A2.1-transgenic rabbit model to study immunity to papillomavirus infection [J]. *J Immunol*, 2006, 177(11): 8037-8045.