

马云辉,王晓堂,高继萍,等. 基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 134-143.

Ma YH, Wang XT, Gao JP, et al. Progress on the use of gene editing technologies in the research of immunodeficient animal models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5):134-143.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.05.015

基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用进展

马云辉,王晓堂,高继萍,宋国华*

(山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

【摘要】 免疫缺陷动物模型在临床前研究中发挥重要作用,是现代生物医学研究领域的重要实验工具,广泛应用于免疫学、遗传学、肿瘤学与微生物学等研究领域。基因编辑是针对生物体基因组进行靶向修饰的技术,从出现到应用,极大推动了生物医学研究领域的发展。基因编辑技术主要包括 HEs、ZFNs、TALENs 与 CRISPR/Cas9 系统。目前,研究者已利用该技术建立了多种类型的免疫缺陷动物模型,各有其优势和局限性。近年来,大量研究证实人源化免疫缺陷动物模型能够精准模拟癌细胞、药物以及免疫系统在人体内的作用,可以更好地模拟人类疾病,广泛用于研究人类免疫生物学及人类复杂疾病的潜在机制。本文对利用基因编辑技术构建免疫缺陷动物模型的研究应用进展进行综述,对基因编辑技术在免疫缺陷动物模型制备中存在的问题及优化策略深入探讨,并对其未来发展前景进行了展望,以期为研究者选用和建立免疫缺陷动物模型提供参考。

【关键词】 免疫缺陷动物模型;基因编辑技术;锌指核酸酶;转录激活因子样效应核酸酶;CRISPR/Cas9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 05-0134-10

Progress on the use of gene editing technologies in the research of immunodeficient animal models

MA Yunhui, WANG Xiaotang, GAO Jiping, SONG Guohua*

(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Immunodeficient animal models play an important role in preclinical research and are important experimental tools in modern biomedical research that are widely used in immunology, genetics, oncology, microbiology, and other research fields. Gene editing is a technology for targeted modification of biological genomes. From emergence to application, it has greatly promoted the development of biomedical research. Gene editing technology mainly includes homing endonucleases, zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and the CRISPR/Cas9 system. Researchers have used these technologies to establish various types of immunodeficient animal models, each with advantages and limitations. In recent years, a large number of studies have confirmed that the human immunodeficient animal model accurately simulates the functions of cancer cells, drugs, and the human immune system, better simulates human diseases,

【基金项目】 国家自然科学基金(31970513);山西省中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022A060);山西省回国留学人员科研项目(2021-086);山西省科技创新人才团队项目(202204051002032);山西省自然科学基金(20210302124093)。

【作者简介】 马云辉(1999—),男,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: hui20210419@126.com

【通信作者】 宋国华(1973—),女,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

and is widely used to study human immunobiology and the potential mechanisms of complex diseases. In this article, we review the progress in the research and application of gene editing technology to the establishment of immunodeficient animal models, discuss in depth the problems and optimization strategies of gene editing technology in the preparation of immunodeficient animal models, and present its future development prospects to provide references for researchers to select and establish immunodeficient animal models.

[Keywords] immunodeficient animal models; gene editing technology; zinc finger nucleases; transcription activator-like effector nucleases; CRISPR/Cas9

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

实验动物是进行生物医学研究的重要实验材料,为相关研究的顺利开展提供源自实验动物“真实世界”的数据支撑。但其用于人类疾病的研究仍具有局限性,例如无法完全模拟人类疾病,缺少针对特定疾病的实验动物,从而导致利用实验动物进行临床试验的结果与预期相差甚远。因此,迫切需要利用特定技术和手段对实验动物加以修饰使之满足对人类疾病的研究要求,而基因编辑技术的出现正好满足这种需要。

基因编辑技术是指通过核酸酶对靶基因进行定点改造,实现特定 DNA 的定点敲除、敲入以及突变等,以使动植物、细胞等获得新表型的一种新型技术,极大地丰富了实验动物的品种品系。基因编辑技术主要包括归巢核酸内切酶 (homologous endonuclease, HEs)、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) 与规律成簇间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas9) 等^[1]。尽管基因编辑动物的出现拓展了相关疾病研究,但由于人源细胞在异种移植时免疫排斥反应等的局限性,极大限制了其在相关疾病中的应用,免疫缺陷动物很好地解决了这一问题。

免疫缺陷动物是指由于先天性遗传突变或用人工的方法改造的免疫功能缺陷的动物,与人类免疫系统缺陷相似,研究肿瘤、血液学、传染病、自身免疫和移植抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD) 等领域的评估都得益于使用免疫缺陷动物模型^[2]。目前,几乎所有类型的人源肿瘤均已在免疫缺陷动物体内建立了移植瘤模型,为肿瘤发生发展及转移机制研究、抗肿瘤药物筛选及治疗方法评估提供了载体。早在 1966 年,Flanagan^[3]首次验证了 Nude 小鼠的免疫缺陷性,由于 *Foxn1* 基因变异导致其 T 细胞缺失,伴随而来的免疫力显著下降,但

NK 细胞活性补偿性增加,正常体液免疫未受影响,人类造血干细胞移植后无法存活,开创了免疫缺陷动物研究的先河。自此,研究者陆续制备了免疫 T、B 以及 NK 细胞缺失的免疫缺陷动物,并推广其在肿瘤学、免疫学等领域研究的应用,尤其是以免疫缺陷动物为基础开发的人源化动物模型为新药研发提供了可靠的体内研究平台^[4]。

基因编辑技术不仅为疾病相关基因功能研究提供便捷途径,也有助于免疫缺陷动物模型构建,进而促进生物和医药等相关领域发展。因此,本文分析比较了 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 技术的优缺点,综述了现有的基因编辑技术在免疫缺陷动物模型的应用及其在人源化动物模型领域的研究,以期为多种人类疾病的研究提供新思路。

1 基因编辑技术的概述

基因编辑系统主要包括早期兴起的 HEs、ZFNs 和 TALENs 等技术,以及近年来以 CRISPR/Cas9 为代表的新型技术。研究者已采用上述技术成功构建了多种基因编辑动物模型^[5-6]。因此,本文首先针对不同的基因编辑技术的主要原理进行概述,并对其优缺点进行比较分析,如表 1 所示。

1.1 HEs

HEs 属于巨核酸酶,存在于各种细菌、真核生物和古生物中^[7]。该酶具有高特异性,能在 14~40 bp 的特定位点上识别并切割双链 DNA,且只与靶 DNA 相互作用。HEs 促进了遗传物质在生物体内的横向移动,该过程被称为“归巢”,其在归巢过程中诱导 DNA 激活双链 DNA 断裂 (double strand breaks, DSBs) 损伤修复。在真核生物中修复途径除同源重组 (homologous recombination, HR) 外,主要为非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)。然而,找到适合靶向特定基因序列的 HEs 的概率极低,实施起来耗时耗力。此外 HEs 的设计的另一困难是其 DNA 结合结构域和 DNA 裂解结构域很难分

离,很大程度上限制了其广泛应用。

1.2 ZFNs

ZFNs 又名锌指核酸酶,来源于真核生物,是杂交异质二聚体蛋白,每个亚基包含多个锌指结构域(锌指蛋白(zinc finger protein,ZFP)串联组成 DNA 结合域)和 1 个 FokI 内切酶结构域(FokI 是来自黄杆菌属细菌的限制性核酸内切酶)。单个 ZFP 识别 9~18 bp 的特定位点,两个单体 ZFN 相互作用产生酶切功能,从而达到靶向 DNA 剪切的目的。ZFNs 通过在特定位点诱导 DNA 中的 DSBs 来促进同源定向修复(homologous directed recombination,HDR)和 NHEJ^[8]。自 1996 年 Kim 等^[9]报道 ZFNs 以来,其显示出相当大的应用前景。目前,利用该酶已经成功地在原核生物和真核生物中进行了基因编辑^[10]。研究者根据靶 DNA 序列设计特异性的锌指蛋白,从而在特定位置导入外源基因,其特异性不仅取决于目标序列本身,还取决于基因组中相邻的序列,因而相比于其他基因编辑技术,ZFNs 具有成本低、剪切效率高的优点。

1.3 TALENs

TALENs 与 ZFNs 相似,也是由 DNA 结合域和 DNA 剪切靶点组成。TALENs 特异性识别 DNA 序列依赖于重复可变残基(repeat variable diresidues,RVDs),1 个锌指域可以识别 3 个碱基对。而 TALENs 的优势在于 1 个模块只能特异识别其 DNA 结合域中的 1 个核苷酸,即使在多个模块连接的情况下,也不会发生识别序列的干扰。这一特性促进了 TALENs 系统的创建,使其可以识别更多的目标序列。由于其目标序列的剪切比 ZFNs 更具有特异性,所以适用于任何生物基因组的任何 DNA 序列。此外,TALENs 也是通过在特定位点诱导 DSBs 来促进 HDR 和 NHEJ,但 TALENs 系统在体细胞和多能干细胞中产生 DSBs 更有效^[11]。目前,基因编辑细胞质中细胞器基因组的操作是具有挑战性的,除了一些 tRNA 可以导入线粒体或叶绿体,将 RNA 分子导入核外细胞器的难度仍较大。值得一提的是,最近有研究者将 TALENs 成功用于细胞器的基因编辑中,实现了线粒体和叶绿体基因组的碱基编辑^[12-13]。但是 TALENs 存在分子量巨大、成本较高

表 1 HEs、ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 比较
Table 1 Comparison of HEs,ZFNs,TALENs and CRISPR/Cas9

比较 Comparison	HEs	ZFNs	TALENs	CRISPR/Cas9
来源 Source	细菌、动植物 Bacteria, animals and plants	真核生物 Eucaryon	细菌 Bacteria	细菌、古菌 Bacteria, archaea
结构 Structure	二聚体 Dimer	二聚体 Dimer	二聚体 Dimer	单体 Monomer
设计简易度 Simplicity of design	困难 Hard	中等 Medium	略微复杂 Slightly complicated	简单 Easy
靶点 DNA 序列的识别区域 Recognition region of the target DNA sequence	归巢核酸内切酶 Homing endonuclease	锌指结构域 Zinc finger domain	重复可变残基 Repeat variable diresidues	crRNA 或 sgRNA crRNA or sgRNA
DNA 的剪切结构 Shear structure of DNA	归巢核酸内切酶 Homing endonuclease	FokI 核酸酶 FokI nuclease	FokI 核酸酶 FokI nuclease	Cas9 蛋白 Cas9 protein
识别靶点大小 Identify the target size	12~40 bp	单体 9~18 bp Monomer 9~18 bp	单体 14~20 bp Monomer 14~20 bp	Cas9 22 bp
优点 Advantages	特异性高 High specificity	效率高 Efficient	特异性高 High specificity	靶向精确 Precise targeting
细胞核外基因组靶向修饰 Extracellular genome targeted modification	否 Cannot	否 Cannot	能 Can	否 Cannot
脱靶效率 Off-target	高 High	较高 Higher	低 Low	稍高 A little high
剪切效率 Shear efficiency	低 Low	高 High	较高 Higher	稍高 A little high
成本 Cost	高 High	低 Low	较高 Higher	低 Low

的局限性。

1.4 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 系统于 2012 年首次被报道^[14]。规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 有时被称为“短规则间隔短重复”, 在 20 世纪 80 年代发现于大肠杆菌中。ZFNs 和 TALENs 技术对 DNA 位点的识别是基于需要 DNA-蛋白质相互作用的人工蛋白对序列的识别, 与 ZFNs 和 TALENs 两种技术不同, CRISPR/Cas 系统的 DNA 识别是 RNA-DNA 相互作用。其是由 Cas9 核酸酶和单链向导 RNA (single guide, sgRNA) 组成。其中 sgRNA 是由 crRNA 和 tracrRNA 组成的单链 RNA 分子, 可以指导 Cas9 定位目标 DNA 并切割它, 在原间隔邻近模体 (protospacer adjacent motif, PAM) 区域产生 DSBs^[15]。Cas9 核酸酶有组氨酸-天冬酰胺-组氨酸 (histidine-asparagine-histidine, HNH) 和 RuvC 两个功能结构域。HNH 结构域剪切与 sgRNA 互补的目标 DNA, RuvC 结构域剪切非目标链。此外, CRISPR/Cas9 也可通过 HDR 和 NHEJ 机制修复 DSBs。但与 TALENs 相比, 在缺乏 sgRNA 的传递方法的情况下, CRISPR/Cas9 系统目前不能直接用于细胞器基因组靶向修饰。

2 免疫缺陷动物概述

免疫缺陷小鼠是最先应用的免疫缺陷动物模型, 其发展主要经历了以下几次重要突破。1966 年 T 细胞缺乏的无胸腺裸鼠 (Nude mouse) 产生, 迄今为止其作为模型鼠用于肿瘤细胞成瘤仍有很高的价值^[2]; 1983 年产生了 T 细胞、B 细胞均缺乏的严重免疫缺陷的重症联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠^[16]; 1991 年研究者首次研发出体内移植人外周血细胞的 Hu-SCID 小鼠^[17]; 1992 年研究者发现了重组激活基因 (recombination activating genes, *Rags*) *Rag1*、*Rag2* 基因敲除免疫缺陷小鼠^[18-19]; 2002 年研究者们在 NOD/SCID 小鼠品系引入白介素 2 受体 γ 链 (interleukin 2 receptor subunit gamma chain, *IL2rg*) 的突变, *IL2rg* 基因编码的蛋白是许多白介素受体的重要信号成分, 包括白介素-2、4、7 和 21, 因此被称为共同 γ 链, 进而产生了目前来讲免疫缺陷程度最高的 NSG 小鼠或 NOG 小鼠^[20]。除此之外, 其他物种的免疫缺陷动物也有很大突破, 例如大鼠、家兔、猪

等。目前, 免疫缺陷动物广泛应用在在肿瘤学研究、免疫学研究、干细胞研究、人源化类器官等方面。

3 基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用

在肿瘤学研究中, 利用免疫缺陷动物模型进行临床前研究至关重要。基因编辑技术在构建免疫缺陷动物模型中起着重要作用, 随着基因编辑技术的逐渐成熟, 各种免疫缺陷动物层出不穷。然而, 自发突变且适用于不同肿瘤研究的基因缺陷和免疫缺陷动物种类少之又少。传统胚胎干细胞打靶低效、耗时、费力、成本高昂、构建时间长, 并且有物种限制性, 只适用于小鼠, 而 CRISPR/Cas9 具有高效、快捷、简便、成本便宜、构建时间短, 无物种限制性等的优势^[21]。随着基因编辑技术的发展, 能够精确到靶向修饰基因, 简化了免疫缺陷动物模型的改造, 使针对性更强、免疫缺陷程度更高的动物模型供给临床前研究。

3.1 基因编辑技术在免疫缺陷小鼠模型研究中的应用

3.1.1 自发性免疫缺陷小鼠

目前, 无胸腺裸鼠在各研究领域特别是肿瘤学、免疫学、药品和生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等方面展现出巨大的价值, 已成为医学生物学研究领域不可缺少的实验动物模型^[22]。裸鼠是由位于 11 号染色体上的隐性基因 *Foxn1* 自发突变导致, 编码的蛋白提前终止而形成截短的无功能蛋白所致, 该编码蛋白可以调节胸腺的发育和角质形成细胞的分化, 突变后导致严重的原发性 T 细胞免疫缺陷和先天性脱发。因为裸鼠仍有 B 细胞和较强的 NK 细胞应答, 所以不适合用作淋巴瘤和白血病的研究。裸鼠来源于近交系, 导致其繁殖能力减弱, 乳腺发育不良, 无法有效哺育后代, 因此裸鼠成瘤模型难以制备。此外, 在裸鼠和重症联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠模型中对人类肿瘤进行异种移植的研究受到了肿瘤生长不良以及宿主对移植反应性的限制, 改变了肿瘤结构和肿瘤微环境^[23]。

3.1.2 基因编辑技术改进的免疫缺陷小鼠

经基因编辑技术改造的严重免疫缺陷的 NOD-SCID 和携带 *IL2rg*^{null} 突变的 NOD^{Rag}^{null} 小鼠 (NSG 和 NRG) 使得人类原发性肿瘤的生长与临床上相似性更高^[24]。2002 年 Ito 等^[20] 将 *IL2rg*^{null} 小鼠回交到 NOD/ShiJic-*Prkdc*^{scid} 小鼠建立了免疫功能严重不

全的 NOD/SCID/ γ_c^{null} (NOD) 小鼠,在移植人造血细胞时有极高的植入后存活率。2005 年 Jakson 实验室通过将 *IL2rg^{null}* 小鼠回交到 NOD/ShiLtSz-*Prkdc^{scid}* 小鼠而得到 NSG 小鼠,该鼠 T、B 淋巴细胞、NK 细胞,树突状细胞和巨噬细胞缺陷,细胞渗漏率极低^[25]。在 CRISPR/Cas9 基因编辑系统出现后,刘亚宸等^[5]利用 CRISPR/Cas9 系统获得了 NOD 突变、成熟 B、T 和 NK 细胞完全缺失的 cNSG (中国 NSG) 小鼠新品系,与美国 Jakson 实验室开发的 NSG 小鼠具有相同的免疫水平,并且缩短了免疫缺陷动物模型的构建时间。M-NSG 重度免疫缺陷小鼠同样如此,其是利用 CRISPR/Cas9 技术在 NOD/SCID 的基础上敲除 *IL2rg* 基因,致该鼠缺失成熟 T、B、NK 细胞,成为目前免疫缺陷程度最高的小鼠之一国际公认的免疫缺陷程度较高,较适合人源细胞或组织移植的工具小鼠^[26]。

NOD *Rag2* gamma (NRG) 小鼠、NOD. Cg-*Rag^{tm1Mom} IL2rg^{tm1Wjl}* 小鼠与 NSG 小鼠非常类似,是由 *Rag* 基因缺失代替 *Prkdc* 基因缺陷^[27]。由 *Prkdc* 缺陷引起的 SCID 免疫缺陷小鼠在患者衍生的异种移植 (patient-derived tumor xenograft, PDX) 对标准化疗反应的研究中,在剂量、频率等方面存在局限性可能是由于 *Prkdc* 编码突变导致 DNA 修复缺陷和极端的放射敏感性,而 *Rag* 基因能够弥补 *Prkdc* 突变导致对辐射敏感等不足。在近些年,基因编辑技术迅猛发展,北京维通达公司利用 CRISPR/Cas9 技术获得 *Rag2* (recombination activating gene 2) 敲除的 C57BL/6 小鼠品系,然后与 NPG/Vst 小鼠杂交,在后代中筛选 *Rag2* 敲除、*IL2rg* 敲除、NOD 型 *Sirpa* 以及 *scid* 基因非纯合的个体,再通过杂合互配的方式获得纯合 NRG 小鼠^[28]。基因编辑技术能够更加快捷、更加高效地构建免疫缺陷动物模型,并能弥补以往免疫缺陷动物模型的缺陷。两种 NRG 小鼠表型主要为无胸腺和成熟 B、T、NK 细胞完全缺失,经由基因编辑技术改造的基因缺陷小鼠模型构建时间短,并且免疫指标相互接近。

3.2 基因编辑技术在免疫缺陷大鼠模型研究中的应用

3.2.1 SCID 大鼠

由于大鼠与人类的生理特性具有很高的相似性,是众多疾病研究的理想选择对象^[29]。成年大鼠的体重是成年小鼠的 10 倍左右,这使他们成为外科手术应用的首选动物模型。大鼠手术通常更容易,

手术造成的组织损伤也更少,并且大鼠可以比小鼠携带更大重量的移植物。另外,大鼠更适合连续样本收集,比如采血等操作,能更好地跟踪检测实验动物生理变化数据,只需更少的动物就能获得足够的材料与数据。更加重要的是,大鼠在药理、毒理实验等方面已有着广泛应用,可以直接对接临床前研究^[30]。小鼠在免疫缺陷动物模型发展早于大鼠,但在基因编辑技术出现后,大鼠免疫缺陷动物模型也在迅猛发展。*Rag* 基因表达和功能损伤会导致 T、B 细胞发育停滞,导致严重的联合免疫缺陷^[31]。2012 年, Zschemisch 等^[6]利用 ZFNs 技术靶向敲除 *Rag1* 构建该基因敲除大鼠,表型特征为胸腺严重发育不良,T、B 细胞比例显著减少,但 NK 细胞代偿性增加,外周血中分离到的 T 细胞群由成熟的 $CD4^+$ / $CD3^+$ /TCR $\alpha\beta^+$ 和 $CD8^+$ / $CD3^+$ /TCR $\alpha\beta^+$ T 细胞组成。在 2012 年, Mashimo 等^[32]利用 ZFNs 技术敲除 *Prkdc* 基因成功构建了 SCID 大鼠。SCID 大鼠表现为生长迟缓、成纤维细胞增殖缺陷和严重的免疫缺陷表型,且胸腺严重发育不良,脾体积减小,T、B 细胞缺陷。2014 年, Tsuchida 等^[33]利用 ZFNs 敲除大鼠 *Rag1* 基因建立了人源肝大鼠模型,该鼠在切除胸腺后可提高人源肝的重建率。2015 年, Liu 等^[34]利用 TALENs 技术敲除大鼠 *Rag2* 基因,建立了免疫缺陷特征与 *Rag1* 敲除大鼠一致,能够高效获得感染天花病毒免疫缺陷大鼠模型。2018 年, Noto 等^[35]利用 TALENs 技术敲除 SD 大鼠 *Rag2* 获得了 SDR 大鼠,与 *Rag1* 基因敲除大鼠一致,该鼠成熟 T 细胞近乎缺失、B 细胞比例显著降低,但 NK 细胞代偿性增加。同样 *Prkdc* 基因敲除大鼠与 *Rag* 基因敲除大鼠有正常 NK 细胞导致移植人类细胞寿命和功能有限,阻碍人类细胞的异种移植。

3.2.2 *IL2rg* 基因敲除大鼠

2010 年 Mashimo 等^[36]利用 ZFNs 靶向敲除大鼠 *IL2rg* 基因,获得了免疫缺陷大鼠 X 连锁重症联合免疫缺陷 (X-severe combined immunodeficiency, X-SCID) 模型。X-SCID 大鼠胸腺严重发育不良,脾轻度缩小,骨髓严重发育不良,几乎完全缺乏 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,但外周血、骨髓和脾均有部分 T 细胞存在,其中 $CD4^+CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+CD8^-$ T 细胞均有减少,外周血和骨髓中 $CD3^-CD45RA^+$ B 细胞和 $CD3^-CD161a^+$ NK 细胞数量明显减少。研究发现 X-SCID 大鼠在移植人类卵巢癌肿瘤细胞后 14 d 内发生肿瘤,成瘤时间短^[36]。X-SCID 动物模型为

药物治疗、基因治疗以及检查异种移植恶性肿瘤治疗效果提供了有价值的体内工具。Mashimo 等^[32]在敲除大鼠 *Prkdc* 基因的基础上敲除 *IL2rg* 基因后构建了 FSG 大鼠,在 FSG 大鼠中无 NK 细胞活性;在 2020 年时,Ménoret 等^[37]利用 HEs 和 TALENs 技术将 *Rag1* 和 *IL2rg* 基因敲除后敲入人信号调节蛋白 α (human signal regulatory protein α , *hSIRP α*) 基因,建立了 RRGs 大鼠。由于 RRGs 大鼠缺乏成熟的 T、B 和 NK 细胞,给 RRGs 大鼠注射人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)能有效地对 RRGs 动物进行免疫人源化,并能检测到抗肿瘤免疫反应。利用基因编辑技术可以成功克服 NK 细胞的代偿性增加后会阻碍人类细胞的异种移植的困难,使构建 PDX、细胞异种移植(cell derived xenograft, CDX)模型更加简便。*hSIRP α* 基因可以增强与人类 CD47 的结合,并通过 CD47-SIRP α 相互作用对大鼠吞噬细胞提供抑制调节(“不要吃我”信号),从而显著增加人造血干细胞(human hemopoietic stem cell, hHSCs)在大鼠骨髓(bone marrow, BM)中的定植和维持,这也为血液疾病研究提供了宝贵的动物模型资源^[38]。

3.2.3 重建人免疫系统大鼠

随着 CRISPR/Cas9 技术在大鼠的应用。2018 年 Yang 等^[39]利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Prkdc* 和 *Il2rg* 基因双敲除表达 *hSIRP α* 的 NSG 样(NSG-like, NSGL)大鼠。NSGL 大鼠缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞,生长迟缓,但表达 *hSIRP α* 。NSGL 大鼠比 SG 大鼠更有效植入人癌细胞,并且 NSGL 大鼠可以植入 hHSCs 来重建人类免疫系统。

2019 年 He 等^[40]通过 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除了大鼠的 *Rag1*、*Rag2* 和 *IL2rg* 基因,获得了 SD-RG 大鼠。SD-RG 大鼠与 FSG 和 NSGL 大鼠类似,缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞。SD-RG 大鼠胸腺急剧缩小,脾与野生型相当。相较于 NSG 小鼠,在 SD-RG 大鼠上肿瘤移植后 20 d 生长体积是 NSG 小鼠的 10 倍,适用于建立癌细胞 CDX 模型,并且肿瘤生长速度优于 NSG 小鼠。研究者通过该免疫缺陷模型成功建立了首例肺鳞癌的 PDX 大鼠模型,移植肿瘤生长迅速并具有原发肿瘤的病理学特征^[40]。

3.3 基因编辑技术在免疫缺陷家兔模型研究中的应用

家兔作为经典的实验动物,与人类基因同源性较高,成本较低、繁殖力强,且无胚胎干细胞、体细

胞克隆技术效率低的限制^[41]。因此,对其基因组进行高效的遗传改造,将促进其在生物医学模型中的广泛应用。2021 年, Song 等^[42]通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *Foxn1* 基因开发了裸兔模型,该兔无毛、无胸腺,并表现出指甲营养不良, T 淋巴细胞减少^[43]。目前,裸鼠是 CDX/PDX 研究的主要模型物种,裸兔能够扩展用作 CDX 和 PDX 研究的中型动物模型,可用于癌症研究、药物开发,并在再生医学中有广泛的应用。SCID 表型是由于 *Prkdc* 基因缺陷引起, 2018 年, Song 等^[44]通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *Prkdc* 构建了 SCID 兔,其 T、B 淋巴细胞缺失,这些 SCID 兔模型有助于研究细菌和肺孢子虫感染,促进免疫缺陷患者早期诊断和治疗的发展^[44]。相似的,利用 ZFNs 敲除 *IL2rg* 构建的 X-SCID 大鼠,该技术也同样能应用在家兔中, Hashikawa 等^[45]通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *IL2rg* 基因构建的 X-SCID 兔能够正常发育并在四代内稳定遗传,缺乏 B、T 和 NK 细胞,并且 X-SCID 兔可以移植与人类相近或相同数量的细胞。由于 X-SCID 兔 NK 细胞缺失,使得此模型移植人癌细胞具有更好的效果。

3.4 基因编辑技术在免疫缺陷猪模型研究中的应用

猪在解剖学和生理学上比鼠、家兔更类似于人类,使他们成为临床前再生医学和癌症研究的宝贵工具^[46]。现有研究中已有多种由各种基因编辑技术构建的 SCID 猪模型,包括 *ARTEMIS*、*IL2rg* 或 *Rag1/2* 基因突变, SCID 猪具有缺乏 NK 细胞、T 细胞或 B 细胞的免疫表型^[47]。2016 年, POWELL 等^[48]发现由 *Artemis* 隐性突变引起的 SCID 猪缺乏 T、B 细胞,但拥有 NK 细胞,并且证明了人类癌细胞可以在体外被来自非 SCID 和 *Artemis* SCID 猪的活化 NK 细胞识别和杀死,导致在 SCID 猪中人类细胞移植效果差。2014 年, Huang 等^[49]应用 TALENs 技术敲除猪 *Rag1/2* 建立无成熟 T、B 淋巴细胞的 SCID 猪模型;以及 Lee 等^[50]利用 TALENs 技术敲除猪 *Rag2* 构建出的 SCID 猪模型,然而在移植人类细胞时效果仍然不佳。Watanabe 等^[51]研究者将公猪 X 染色体上的 *IL2rg* 利用 ZFNs 技术敲除后构建 X-SCID 猪^[51-52];以及 Kang 等^[53]利用 CRISPR/Cas9 技术以更高的效率靶向敲除猪 *IL2rg* 构建雌性 SCID 猪。不同的基因编辑技术构建出的 SCID 猪具有相同的表型,缺乏 T 细胞和 NK 细胞^[51]。2016 年, Lei 等^[54]通过 CRISPR/Cas9 系统靶向敲除 *Rag2/IL2rg*

基因,构建缺乏 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞的 SCID 猪模型,能够移植人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。Boettcher 等^[55]利用 CRISPR/Cas9 靶向突变 *ART*^{-/-} 胎儿成纤维细胞细胞系中的 *IL2rg* 基因构建 *ART*^{-/-} *IL2rg*^{-/-} SCID 猪。这种猪 T、B、NK 细胞都缺乏,在导入人 CD34⁺ 脐带血干细胞建立了人源化模型。基因编辑技术敲除 *IL2rg* 构建出的 SCID 猪缺乏 T 细胞和 NK 细胞,在移植人类细胞时具有良好的效果^[56]。与小鼠免疫缺陷模型类似,应用基因编辑技术后敲除 *IL2rg* 基因后,陆续开发出针对特定疾病的免疫缺陷猪,如 *Rag2*⁻/*IL2rg*⁻/*YFAH*^{-/-} (RGFKO) 猪,能较好地移植人肝细胞^[57]。

表 2 总结了近年来免疫缺陷的动物模型,包括小鼠、大鼠、家兔和猪。

4 基因编辑技术在免疫缺陷动物模型研究中新应用

4.1 免疫缺陷动物在人源化动物模型制备中的潜在价值

人源化动物模型是在免疫缺陷动物模型的基础上建立起来的,是指将人类细胞或组织植入免疫缺陷动物体内构建免疫系统人源化动物模型及人源化动物疾病模型,由于免疫系统缺陷,来源于人

的移植物才可在免疫缺陷动物体内存活^[58]。基于已有研究可知,人源化动物模型相较于普通动物模型能够更精确地模拟包括肿瘤在内的多种疾病在人体内的发生发展进程,为临床治疗提供精准的研究材料。

4.2 基因编辑技术在人源化动物模型制备中的应用

近年来,随着基因编辑技术的快速发展,广泛应用于人源化动物模型制备,极大推动了人源化动物模型的推广与应用,越来越多的新型人源化动物模型不断涌现^[59]。目前,采用基因编辑技术构建的人源化动物模型主要包括重建人免疫系统、基因人源化及嵌合体人源化动物模型。人源化免疫系统动物可分为人源化外周血单核细胞(huPBMCs)或人源化外周血淋巴细胞(huPBLs)、人源化造血干细胞(huHSCs)和人源化骨髓、肝、胸腺(huBLT)动物模型,且 huPBMCs (或 huPBLs)、huHSCs 和 huBLT 重建人免疫系统有不同的优缺点^[60]。基因人源化动物模型是利用转基因或同源重组技术,将人源基因插入动物基因组,从而表达人源基因而不是动物自身基因。Huang 等^[61]使用腺相关病毒(adenovirus-associated virus, AAV)载体在移植人类白细胞抗原 A2(human leukocyte antigen A2, HLA-A2)/HDD 至

表 2 近年来免疫缺陷动物模型
Table 2 Animal models of immune deficiency in recent years

动物种类 Animal species	突变 Mutations	突变方法 Mutation methods	细胞表型 Cell phenotypes	参考文献 References
小鼠 Mouse	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i>	杂交遗传	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[20, 25]
	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i>	Hybridization		
	<i>IL2rg</i> , <i>Rag1</i> / <i>Rag2</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[26]
		CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[27]
大鼠 Rats	<i>Rag1</i>	HEs, ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[33–34]
	<i>Rag2</i>	TALENs	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[35, 37]
	<i>Rag1</i> , <i>IL2rg</i> , <i>hSIRPα</i>	HEs, TALENs	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[37]
	<i>Prkdc</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[32]
	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[32]
	<i>IL2rg</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[36]
	<i>Prkdc</i> , <i>IL2rg</i> , <i>hSIRPα</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[39]
	<i>Rag1</i> , <i>Rag2</i> , <i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[40]
家兔 Rabbits	<i>Foxn1</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁺ NK ⁺	[42]
	<i>Prkdc</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁺	[44]
	<i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[45]
	<i>IL2rg</i>	ZFNs	T ⁻ B ⁺ NK ⁻	[51]
猪 Pigs	<i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁺ NK ⁻	[53]
	<i>Rag1</i> /2	TALENs	T ⁻ B ⁻	[49]
	<i>Rag2</i>	TALENs	T ⁻ B ⁻	[50]
	<i>Rag2</i> , <i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[54]
	<i>ARTEMIS</i> , <i>IL2rg</i>	CRISPR/Cas9	T ⁻ B ⁻ NK ⁻	[55]

NSG 小鼠,诱导表达人 HLA-A2。此外,Sharma 等^[62]也使用 AAV 载体移植 HLA-DR 导入 NSG 小鼠中,表达人 HLA-II 类(DR1 或 DR4),在感染呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)后,病毒清除速度比 NSG 小鼠快。表达主要组织相容性复合体-I(major histocompatibility complex I, MHC-I)类(HLA-A2)和 MHC-II 类(HLA-DR4)转基因的人免疫系统重建小鼠在免疫系统重建后产生 CD8⁺ T 细胞和细胞毒性,发生流感特异性抗体应答,而表达 MHC-I 类(HLA-A2)的小鼠中没有此现象^[63]。人源化动物在人类疾病方面具有广泛应用价值,构建多种人源化动物模型对于研究人类疾病发生发展、治疗手段等都有巨大的益处。

5 总结与展望

在最初偶然发现的裸小鼠到现今能够通过基因编辑技术靶向修饰基因构造免疫缺陷动物模型,是技术迭代进步,不断更新的结果,新技术带来的往往是更加高效且简便的方法。第三代基因编辑技术 CRISPR/Cas9 相较于 HEs、ZFNs、TALENs,以其设计简便、靶向更加精确、成本低等的优点,对免疫缺陷动物模型的构建起到了巨大作用。从自然突变而来的寥寥几种免疫缺陷动物模型,到利用基因编辑技术对目标物种特定基因进行修饰,数种免疫缺陷动物模型应运而生,免疫缺陷程度也有了质的提升,对肿瘤学、血液学、免疫学、药理学等研究领域大有裨益,更能够精确模拟人癌细胞、药物、免疫系统在人体内的作用。研究者能够根据自己的实验目的选择最适的免疫缺陷动物。

以免疫缺陷动物模型为基础的人源化动物模型,在当前的生物医学研究中具有重要地位^[64]。免疫缺陷小鼠是经典的免疫缺陷动物模型,发展迅速,品系众多,应用广泛。相较于小鼠,大鼠具有很多优势,肿瘤可以生长到小鼠允许的近 10 倍体积,采血量可满足血癌疗效评估、临床病理分析和药代动力学研究用量。肿瘤大鼠模型可同时评估化疗疗效、药代动力学以及初步测试毒理学,大大减少动物使用量大鼠模型具有重要的研究意义。猪在解剖结构及生理、免疫特性上与人类更相近,因此可构建人源化猪模型来大量生产人源多克隆抗体^[65]。目前,尚未有人源化动物模型完全模拟人类免疫系统,基因编辑技术在基因敲入方面具有独特优势,目前已构建出多种人免疫相关基因敲入动物

模型,有助于人源化免疫缺陷动物模型的构建,随着基因编辑技术的不断发展,有望构建出再现人类免疫缺陷系统的动物模型,为研究疾病发病机制、新型疗法以及药物开发和评价提供更加匹配的疾病动物模型。

参考文献:

- [1] JIANG C, MENG L, YANG B, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment [J]. Clin Genet, 2020, 97(1): 73-88.
- [2] FUJIWARA S. Humanized mice: a brief overview on their diverse applications in biomedical research [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 2889-2901.
- [3] FLANAGAN S P. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse [J]. Genet Res, 1966, 8(3): 295-309.
- [4] HUDSON W A, LI Q, LE C, et al. Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects [J]. Leukemia, 1998, 12(12): 2029-2033.
- [5] 刘亚宸, 陈渠, 杨兴龙, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ 免疫缺陷小鼠 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(6): 639-646.
LIU Y C, CHEN Q, YANG X L, et al. Generation of a new strain of NOD/SCID/IL2R $\gamma^{-/-}$ mice with targeted disruption of Prkdc and IL2R γ genes using CRISPR/Cas9 system [J]. J South Med Univ, 2018, 38(6): 639-646.
- [6] ZSCHEMISCH N H, GLAGE S, WEDEKIND D, et al. Zinc-finger nuclease mediated disruption of Rag1 in the LEW/Ztm rat [J]. BMC Immunol, 2012, 13: 60.
- [7] BABARYKA A, KÜHN E, KÖSTER R W. *In vivo* synthesis of meganuclease for generating transgenic zebrafish *Danio rerio* [J]. J Fish Biol, 2009, 74(2): 452-457.
- [8] SHALTZ S, JINKS-ROBERTSON S. Mutagenic repair of a ZFN-induced double-strand break in yeast: effects of cleavage site sequence and spacer size [J]. DNA Repair, 2021, 108: 103228.
- [9] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [10] JAISWAL S, SINGH D K, SHUKLA P. Gene editing and systems biology tools for pesticide bioremediation: a review [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 87.
- [11] JONLIN E C. Informed consent for human embryo genome editing [J]. Stem Cell Reports, 2020, 14(4): 530-537.
- [12] TAN J, FORNER J, KARCHER D, et al. DNA base editing in nuclear and organellar genomes [J]. Trends Genet, 2022, 38(11): 1147-1169.
- [13] BHARDWAJ A, NAIN V. TALENs-an indispensable tool in the era of CRISPR: a mini review [J]. J Genet Eng Biotechnol, 2021, 19(1): 125.

- [14] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, 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.
- [15] LI C, BRANT E, BUDAK H, et al. CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(4): 253-284.
- [16] BOSMA G C, CUSTER R P, BOSMA M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse [J]. *Nature*, 1983, 301(5900): 527-530.
- [17] ROWE M, YOUNG L S, CROCKER J, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man [J]. *J Exp Med*, 1991, 173(1): 147-158.
- [18] SHINKAI Y, RATHBUN G, LAM K P, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D) J rearrangement [J]. *Cell*, 1992, 68(5): 855-867.
- [19] MOMBAERTS P, IACOMINI J, JOHNSON R S, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes [J]. *Cell*, 1992, 68(5): 869-877.
- [20] ITO M, HIRAMATSU H, KOBAYASHI K, et al. NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3175-3182.
- [21] 张丽娜, 刘国安, 杨红. 基因打靶技术的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010, 36(9): 51-55.
ZHANG L N, LIU G A, YANG H. The research progress of gene targeting [J]. *Biotechnol Bull*, 2010, 36(9): 51-55.
- [22] FOGH J, FOGH J M, ORFEO T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1977, 59(1): 221-226.
- [23] TYAGI R K, LI J, JACOBSE J, et al. Humanized mouse models of genetic immune disorders and hematological malignancies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174: 113671.
- [24] MAYKEL J, LIU J H, LI H, et al. NOD-scidIl2rg (tm1Wjl) and NOD-Rag1 (null) Il2rg (tm1Wjl): a model for stromal cell-tumor cell interaction for human colon cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(6): 1169-1179.
- [25] SHULTZ L D, LYONS B L, BURZENSKI L M, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells [J]. *J Immunol*, 2005, 174(10): 6477-6489.
- [26] ZHANG H, LI F, CAO J, et al. A chimeric antigen receptor with antigen-independent OX40 signaling mediates potent antitumor activity [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(578): eaba7308.
- [27] PEARSON T, SHULTZ L D, MILLER D, et al. Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice; a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(2): 270-284.
- [28] BARVE A, CASSON L, KREM M, Et al. Comparative utility of NRG and NRGS mice for the study of normal hematopoiesis, leukemogenesis, and therapeutic response [J]. *Exp Hematol*, 2018, 67: 18-31.
- [29] HE X, LIU Y, USA K, et al. Ultrastructure of mitochondria and the endoplasmic reticulum in renal tubules of Dahl salt-sensitive rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(10): F1190-F1197.
- [30] 刁元元, 李玉梅, 李晓文, 等. 黄芪抗糖尿病并发症的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 123-128.
DIAO Y Y, LI Y M, LI X W, et al. Review of Astragali radix for treating diabetic complications [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 123-128.
- [31] YOSHIKAWA G, MIYAZAKI K, OGATA H, et al. The evolution of rag gene enhancers and transcription factor E and id proteins in the adaptive immune system [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5888.
- [32] MASHIMO T, TAKIZAWA A, KOBAYASHI J, et al. Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(3): 685-694.
- [33] TSUCHIDA T, ZHENG Y W, ZHANG R R, et al. The development of humanized liver with Rag1 knockout rats [J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(4): 1191-1193.
- [34] LIU Q, FAN C, ZHOU S, et al. Bioluminescent imaging of vaccinia virus infection in immunocompetent and immunodeficient rats as a model for human smallpox [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11397.
- [35] NOTO F K, ADJAN-STEFFEY V, TONG M, et al. Sprague dawley Rag2-null rats created from engineered spermatogonial stem cells are immunodeficient and permissive to human xenografts [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(11): 2481-2489.
- [36] MASHIMO T, TAKIZAWA A, VOIGT B, et al. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8870.
- [37] MÉNORET S, OUISSE L H, TESSON L, et al. *In vivo* analysis of human immune responses in immunodeficient rats [J]. *Transplantation*, 2020, 104(4): 715-723.
- [38] MURATA Y, TANAKA D, HAZAMA D, et al. Anti-human SIRP α antibody is a new tool for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1300-1308.
- [39] YANG X, ZHOU J, HE J, et al. An immune system-modified rat model for human stem cell transplantation research [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(2): 514-521.
- [40] HE D, ZHANG J, WU W, et al. A novel immunodeficient rat model supports human lung cancer xenografts [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 140-150.
- [41] 薛莹, 范江霖, 刘恩岐. 基因修饰家兔研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(3): 169-177.
XUE Y, FAN J L, LIU E Q. Genetically modified rabbit models for medical sciences [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2019, 39(3):

- 169–177.
- [42] SONG J, HOENERHOFF M, YANG D, et al. Development of the nude rabbit model [J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(3): 656–665.
- [43] ROLSTAD B. The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses? [J]. Immunol Rev, 2001, 184: 136–144.
- [44] SONG J, WANG G, HOENERHOFF M J, et al. Bacterial and *Pneumocystis* infections in the lungs of gene-knockout rabbits with severe combined immunodeficiency [J]. Front Immunol, 2018, 9: 429.
- [45] HASHIKAWA Y, HAYASHI R, TAJIMA M, et al. Generation of knockout rabbits with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using CRISPR/Cas9 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9957.
- [46] YAN S, TU Z, LIU Z, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease [J]. Cell, 2018, 173(4): 989–1002.
- [47] BOETTCHER A N, LOVING C L, CUNNICK J E, et al. Development of severe combined immunodeficient (SCID) pig models for translational cancer modeling; future insights on how humanized SCID pigs can improve preclinical cancer research [J]. Front Oncol, 2018, 8: 559.
- [48] POWELL E J, CUNNICK J E, KNETTER S M, et al. NK cells are intrinsically functional in pigs with Severe Combined Immunodeficiency (SCID) caused by spontaneous mutations in the *Artemis* gene [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2016, 175: 1–6.
- [49] HUANG J, GUO X, FAN N, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency [J]. J Immunol, 2014, 193(3): 1496–1503.
- [50] LEE K, KWON DN, EZASHI T, et al. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(20): 7260–7265.
- [51] WATANABE M, NAKANO K, MATSUNARI H, et al. Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76478.
- [52] HARA H, SHIBATA H, NAKANO K, et al. Production and rearing of germ-free X-SCID pigs [J]. Exp Anim, 2018, 67(2): 139–146.
- [53] KANG J T, CHO B, RYU J, et al. Biallelic modification of IL2RG leads to severe combined immunodeficiency in pigs [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2016, 14(1): 74.
- [54] LEI S, RYU J, WEN K, et al. Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25222.
- [55] BOETTCHER A N, LI Y, AHRENS A P, et al. Novel engraftment and T cell differentiation of human hematopoietic cells in *ART^{-/-}IL2RG^{-Y}* SCID pigs [J]. Front Immunol, 2020, 11: 100.
- [56] SUZUKI S, IWAMOTO M, SAITO Y, et al. IL2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 753–758.
- [57] ZHAO H, YE W, GUO J, et al. Development of *RAG2^{-/-}IL2Rγ^{-Y}* immune deficient FAH-knockout miniature pig [J]. Front Immunol, 2022, 13: 950194.
- [58] 连晶瑶, 丁苗慧, 秦国慧, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 113–119.
- LIAN J Y, DING M H, QIN G H, et al. Research progress of humanized mouse models in immune system [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(10): 113–119.
- [59] KA Y, ITO R, NOZU R, et al. Establishment of a human microbiome-and immune system-reconstituted dual-humanized mouse model [J]. Exp Anim, 2023, 72(3): 402–412.
- [60] CHEN J, LIAO S, XIAO Z, et al. The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1007579.
- [61] HUANG J, LI X, COELHO-DOS-REIS J G, et al. An AAV vector-mediated gene delivery approach facilitates reconstitution of functional human CD8⁺ T cells in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88205.
- [62] SHARMA A, WU W, SUNG B, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) pulmonary infection in humanized mice induces human anti-RSV immune responses and pathology [J]. J Virol, 2016, 90(10): 5068–5074.
- [63] MENDOZA M, BALLESTEROS A, QIU Q, et al. Generation and testing anti-influenza human monoclonal antibodies in a new humanized mouse model (DRAGA: HLA-A2. HLA-DR4. Rag1 KO. IL-2Rγc KO. NOD) [J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(2): 345–360.
- [64] ADIGBLI G, MÉNORET S, CROSS A R, et al. Humanization of immunodeficient animals for the modeling of transplantation, graft versus host disease, and regenerative medicine [J]. Transplantation, 2020, 104(11): 2290–2306.
- [65] CHEN F, WANG Y, YUAN Y, et al. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(8): 437–444.

[收稿日期]2022–11–07