

# 基因修饰猪作为人类疾病模型的研究进展

杨化强, 赖良学

中国科学院广州生物医药与健康研究院, 中国科学院再生生物学重点实验室, 广州 510530

**摘要** 对近来有关基因修饰猪作为人类疾病模型的研究进行综述。建立疾病动物模型有利于探索疾病的致病机制, 开发治疗药物和诊治途径, 是人类疾病临床前研究的重要环节, 对实验到临床(B2B)的转化医学研究至关重要。通过基因修饰手段获得的带有人类疾病的模型动物具有遗传稳定性和来源的可重复性, 对相应人类疾病的研究更具有举足轻重的作用。由于与人类生理特征具有诸多相似性, 猪可以作为良好的人类疾病动物模型, 并且比传统的啮齿类疾病动物模型更具有优势。随着大动物胚胎操作技术和基因操作技术的日渐成熟, 近年来对通过基因修饰猪建立的人类疾病模型的研究进展也逐步加快。

**关键词** 猪; 转基因; 基因打靶; 疾病模型

**中图分类号** Q-1

**文献标识码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.30.008

## Progress on Studies of Genetically Modified Pigs for Human Disease Models

YANG Huaqiang, LAI Liangxue

Key Laboratory of Regenerative Biology, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China

**Abstract** The animal models of human disease could facilitate the studies of disease pathogenesis and the development of new drugs and treatments. It is an essential step in the preclinical research and the translational medicine studies of Bench to Bedside (B2B). The animal models established by the genetic modification are paid particular attentions due to their genetic stability and repeatable availability. Due to the many similarities between pig and human in physiological characteristics, pig can be a good animal model of human diseases with many advantages over the conventional rodent model. The human disease model using genetically modified pigs sees great progress along with the development of embryo manipulation technologies and genetic modification technologies in large mammals. In this paper, the research advances on genetically modified pigs for human disease models in recent years are reviewed.

**Keywords** pig; transgenesis; gene targeting; disease model

### 0 引言

猪在解剖学、生理学、营养代谢和疾病特征等方面都与人有较大的相似性。猪具有较长的生命周期(12—15a), 5个月即能达到性成熟, 繁殖快, 易于饲养, 在生物医学研究领域具有重要的应用价值。相比于大小鼠, 猪与人类更加接近; 相比于非人灵长类动物, 猪没有苛刻的伦理道德和动物保护方面的要求, 加上饲养和试验成本较低, 猪已成为一种理想的实验动物模型<sup>[1]</sup>。

猪作为实验动物的一个重要应用是建立人类疾病模型。合适的动物模型对研究疾病的发生机制, 评估治疗药物、治疗策略的有效性和安全性具有重要意义。在过去的1个世纪里, 几乎所有的医学进展实际上都利用了动物模型。通过基因操作获得的带有某种遗传性疾病的模型动物能在分子机制上模拟疾病的发生、发展机制, 由于在疾病症状上具有的遗传稳定性和易于扩大的种群, 比传统的自发或诱发性疾病模型动物更具有优势。基因修饰实验动物模型对研究人类疾

收稿日期: 2011-10-09; 修回日期: 2011-10-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2011CB944204)

作者简介: 杨化强, 助理研究员, 研究方向为基因修饰猪, 电子邮箱: yang\_huaqiang@gibh.ac.cn; 赖良学(通信作者), 研究员, 研究方向为克隆动物与干细胞, 电子邮箱: lai\_liangxue@gibh.ac.cn

病相关基因功能、疾病表型与基因型的联系以及疾病的诊断、治疗都具有重要作用。

目前广泛应用于模拟人类疾病的模型动物是以小鼠为代表的啮齿类动物,这主要是因为易于对小鼠进行基因修饰操作。小鼠可体外培养,具有持续传代的稳定胚胎干细胞系(Embryonic Stem Cells,ES)和诱导性多能干细胞系(Induced Pluripotent Stem Cells,IPS),因此可在ES或IPS上较为方便地进行转基因或基因打靶操作,再以基因修饰的ES或IPS细胞制备嵌合体小鼠,经传代即可获得基因修饰小鼠<sup>[2]</sup>。但是小鼠作为人类疾病模型动物在许多方面具有不足之处,因为小鼠的诸多生理性状还与人相距较远,所以在很多方面如心血管系统等,小鼠模型并不能很好地模拟部分人类疾病。而其他动物,如猪等大型动物的ES或IPS一直没有建立,所以对它们进行基因操作较为困难,大型动物的基因修饰研究一直进展缓慢。近年来,体细胞核移植技术(Somatic Cell Nuclear Transfer,SCNT)的发展使得对猪等大型动物进行高效的基因操作成为可能<sup>[3]</sup>。应用该技术只需要对猪的体细胞进行基因修饰,而后通过体细胞核移植即可获得可稳定遗传的基因修饰猪。此项技术的发展也推进了猪作为人类疾病动物模型的研究。

## 1 猪的基因修饰方法

### 1.1 转基因策略

转基因即将外源基因导入动物体内,并使外源基因整合入动物本身的基因组内,可以随着动物自身细胞的分裂而增殖,能在动物体内稳定存在并遗传给下一代。最早的转基因猪的制备方法是原核显微注射法(Pronuclear Injection),其原理就是采用显微操作技术将外源基因直接注射到实验动物的受精卵中,使注射的外源基因整合入胚胎基因组,再通过胚胎移植技术将整合有外源基因的受精卵移植到受体子宫内发育,由此得到转基因动物。该方法的实验周期短,操作也较为简单。但缺点是转基因效率低,有报道称通过对猪等大型家畜的胚胎进行原核注射获得转基因动物的效率约为1%—10%<sup>[4]</sup>。另有逆转录病毒或慢病毒介导的转基因技术。逆转录病毒感染宿主细胞后能将自身cDNA整合入宿主染色体,故可用逆转录病毒携带目的基因来感染除去透明带的着床前胚胎(或将病毒直接注射入透明带下)。该方法能介导外源基因的高效转移,但是病毒具有潜在的致病危害,并且产生嵌合体的比例较高。

目前在转基因猪的制备中应用最广泛也最有效的技术为体细胞核移植技术。该技术包括2个步骤:首先将外源基因插入体外培养的动物体细胞内,然后再将转基因体细胞移植到去核卵细胞中,将产生的重构胚植入母体子宫内发育,获得转基因动物。此方法可以在细胞水平上对转基因进行精确操作,只要获得转基因细胞,产生转基因后代的效率为100%。此方法目前已日趋成熟,是国内外大多数实验室对猪

等大型动物进行基因操作的主要技术手段。由于没有有效的ES或IPS存在,在转基因小鼠制备中广泛应用的嵌合体技术在转基因猪的制备中无法得到应用,这也是未来进行攻关的关键之一。

### 1.2 基因打靶策略

基因打靶即在基因组特定的位点进行DNA的改变,从而起到改变动物特定基因表达模式的方法。此方法的关键在于“定点”,这也是基因打靶不同于转基因技术之处。为了实现定点打靶,一般需在细胞内引入一段与打靶位点一致的同源DNA序列,利用细胞的同源重组机制进行同源替换。但是细胞(尤其是体细胞)中发生同源重组的概率极低,约为 $10^{-6}$ <sup>[5]</sup>,因此进行基因打靶操作极为困难。迄今为止,也只有少数研究成功制备了基因打靶猪。有研究报道,如果基因组的打靶位点处发生了双链DNA断裂(Double-Strand Break,DSB),此处发生同源重组的概率要提高 $10^3$ — $10^5$ 倍<sup>[6]</sup>。近年来,新出现的锌指核酸酶(Zinc Finger Nuclease,ZFN)技术<sup>[7]</sup>及转录激活子样效应因子(Transcription Activator-like Effector,TALE)核酸酶技术<sup>[8]</sup>可定点地在细胞基因组上产生双链断裂,可以显著提高该位点基因打靶的效率。

目前ZFN技术已在低等生物以及大小鼠中得到应用,中国科学院再生生物学重点实验室应用ZFN技术对猪的体细胞进行基因打靶,使体细胞基因打靶的效率由原来的 $10^{-6}$ 提高到大于4%,并结合克隆技术成功获得了2头*Ppar-γ*基因敲除猪,首次实现了该技术在大型动物内源性基因敲除中的应用。该研究不仅建立了高效的基因敲除猪制作技术平台,也为其他缺乏胚胎干细胞系的大型动物基因敲除提供了可靠的技术手段<sup>[9]</sup>。

## 2 基因修饰猪作为人类疾病模型的研究

疾病与基因有很强的相关性,尤其是遗传性疾病,建立各种人类疾病的基因修饰动物模型,对人类疾病的发病机制、诊断和治疗学的研究必将起到极大的促进作用。目前,猪的基因修饰技术已日趋高效和成熟,通过基因修饰猪建立人类疾病模型也日益为研究者们所重视。目前已有文献报道的通过基因修饰猪建立的人类疾病模型见表1。

### 2.1 神经系统疾病

目前,已经建立了多种针对神经退行性疾病的转基因猪模型。亨廷顿舞蹈症(Huntington's Disease,HD)是常染色体显性遗传,以特定神经元退化为特征的进行性神经退行性疾病。该种疾病的发生被认为与*huntingtin*基因(*HTT*)5'端区域的CAG三碱基(编码谷氨酰胺)重复突变有关。早在2001年,Uchida等<sup>[10]</sup>就以显微注射方法制备了*HTT*转基因猪。转基因以大鼠神经元特异性的*enolase*(*Nse*)启动子启动表达,3.3kb的猪5'端*HTT*cDNA携带了75个CAG重复突变。此研究一共产生了5只转基因猪,分别在不同的整合位点上携带了1—3个外源基因拷贝。迄今为止,还没有关于它们疾病发展

表 1 基因修饰猪的人类疾病模型  
Table 1 Genetically modified pigs as human disease models

人类疾病	基因修饰	制作方法	文献
亨廷顿舞蹈症	以 Nse 启动子表达携带 75 个 CAG 重复突变的猪 <i>HTT</i> 基因	原核注射	[10]
	以 CAG 启动子表达携带 105 或 160 个 CAG 重复突变的人 <i>HTT</i> 基因	体细胞核移植	[11]
阿尔茨海默病	以 PDGF- $\beta$ 启动子表达人 <i>APP<sub>sw</sub></i> 突变基因	体细胞核移植	[12]
脊髓性肌萎缩症	猪 <i>SMN</i> 基因敲除	体细胞核移植	[13]
心血管疾病	猪 <i>Ppar-<math>\gamma</math></i> 基因敲除	体细胞核移植	[9]
	Tie2 启动子表达猪的 <i>eNOS</i> 基因	体细胞核移植	[14]
	Tie2 启动子表达人的 <i>Catalase</i> 基因	体细胞核移植	[15]
II 型糖尿病	大鼠 <i>Ins2</i> 启动子表达人的 <i>GIPR<sup>dn</sup></i> 突变基因	慢病毒注射	[16]
家族性早发 III 型糖尿病	猪 <i>insulin</i> 启动子表达人的 <i>HNF-1<math>\alpha</math>P291fsinsC</i> 突变基因	体细胞核移植	[17]
囊性纤维化	猪 <i>CFTR</i> 基因敲除或 <i>CFTR</i> deltaF508 基因敲入	体细胞核移植	[18]
视网膜色素变性	包含猪 <i>rhodopsin</i> (P347L) 编码区, 5' 端和 3' 端调控的序列的基因组序列	原核注射	[19]
	包含猪 <i>rhodopsin</i> (P347 或 P347S) 编码区, 5' 端和 3' 端调控的序列的基因组序列	原核注射	[20]
Stargardt 黄斑 营养不良	Rho4.4 启动子表达 <i>ELOVL4</i> 5 bpdel 和 Y270terEYFP 突变基因	体细胞核移植	[21]

的进一步研究报道。Yang 等<sup>[10]</sup>于 2010 年以体细胞核移植制备了 HD 转基因疾病模型猪, 该转基因猪以增强型的  $\beta$ -actin 启动子表达具有 105 个或 160 个谷氨酰胺重复突变的人类 *HTT* 基因。相比于以前的小鼠疾病模型, 转基因猪在病理特征和疾病症状的表现上与人类更具有相似性。该转基因猪模型不仅展示了明显的 HD 患者的行为特征, 而且可以在其脑中观察到神经元的凋亡, 而在常用的小鼠模型中却无法检测到神经元的死亡, 可见转基因猪是更好的 HD 模型。

对老年痴呆症 (Alzheimer's Disease) 模型猪也有初步报道, 该转基因猪以 PDGF- $\beta$  启动子特异地在神经系统启动 *APP695sw* 的表达, 较好地模拟了毒性 A $\beta$  蛋白在神经系统表达和沉积的疾病特征。研究者预计, 随着年龄的增加, 病理性蛋白的聚集和临床症状上的表现将会逐渐展现出来<sup>[12]</sup>。

Lorson 等<sup>[13]</sup>对猪的运动神经元生存蛋白 (*Survival Motor Neuron, SMN*) 基因进行打靶, 造成该基因表达缺失, 为研究脊髓性肌萎缩症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA) 建立疾病猪模型。研究者尝试以同源重组载体对 *SMN* 基因位点进行同源打靶, 筛选了 500 多个细胞克隆, 但是没有获得打靶的细胞。因为单链 DNA 发生同源重组的概率要显著高于双链 DNA, 为了克服体细胞同源重组低效率带来的操作困难, 研究者巧妙地将打靶载体处理成单链, 当以单链同源重组载体转染细胞后, 研究者在 300 多个细胞克隆中鉴定出 3 个打靶细胞克隆, 并成功克隆出敲除了 1 个 *SMN* 基因拷贝的克隆猪, 为建立 SMA 疾病猪模型打下了基础。此研究还提出了一种提高体细胞基因打靶效率的策略, 对制备基因敲除大动物具有一定促进作用。

近年来, 中国科学院再生生物学重点实验室也建立了多

种神经退行性疾病的基因修饰猪模型, 包括转 *APP/PS1/Tau* 基因的老年痴呆疾病猪模型、共济失调疾病模型、帕金森疾病模型和脊髓侧索硬化症疾病模型等, 部分基因修饰猪较好地模拟了疾病的发展进程和病理特征, 展示了在神经退行性疾病研究中的应用价值。

## 2.2 心血管系统疾病

转基因小鼠的应用为心血管系统的研究做出了卓越贡献。然而用转基因小鼠进行的许多试验得出了令人困惑的结果。实际上, 越来越多的研究表明, 小型啮齿类动物并不能够精确反映人类的心血管生理学。例如, 小鼠的心动周期只有人类的 1/10 长, 小鼠和人类的心脏在许多方面 (包括分子水平) 存在重要差别。此外, 人类血浆中以低密度脂蛋白 (LDL) 为主, 而小鼠血浆中高密度脂蛋白 (HDL) 是主要的脂蛋白类型, 因此, 采用高脂饮食在小鼠中并不能诱导发生动脉粥样硬化, 并且由于小鼠体型的原因, 难以进行反复采血和中小血管的操作。猪心血管系统的解剖、组织结构、生理代谢及病变特点与人相近, 其体形亦能满足各种外科手术和临床评价之用。猪的脂蛋白代谢机制与人类类似, 特别适合于动脉粥样硬化的研究。猪是进行心血管系统研究的理想实验动物。

2011 年, 中国科学院再生生物学重点实验室培育了 *Ppar- $\gamma$*  基因敲除的克隆猪, 本研究是首次将锌指核酸酶基因打靶技术应用于猪内源性基因敲除研究, 成功敲除了猪内源性 *Ppar- $\gamma$*  基因的一个拷贝, 开创了对大动物进行基因打靶的新局面<sup>[9]</sup>。PPAR- $\gamma$  是胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物 (Thiazolidinediones, TZDs) 作用的靶分子, 也是近年来的研究热点。TZDs 作为 PPAR- $\gamma$  激动剂而增加胰岛素敏感性, 使得它成为 II 型糖尿病的治疗药物, 其市面上比较畅销的药物包括

文迪雅(Avandias)和艾可拓(Actos)。然而 TZDs 对心血管的安全性却备受争议<sup>[22-23]</sup>。在小鼠模型中, TZDs 类药物对小鼠的心血管系统具有显著的保护作用, 然而有研究显示它能增加服用病人心肌梗死的风险至 43%。因此除了小鼠模型外, 需要更加符合人类心血管系统的动物模型。基于前述各种优势, 猪无疑是理想的选择, *Ppar-γ* 基因敲除猪模型将为心血管疾病研究和相关药物开发起到重要作用。同时, 该实验室还建立了心脏特异性高表达 *Ppar-γ* 的转基因猪模型, 该模型将与 *Ppar-γ* 基因敲除猪一起, 对 PPAR- $\gamma$  的体内精确调控机制、相关疾病的病理病因和以 PPAR- $\gamma$  为靶点的药物开发提供新的研究平台。

Prather 实验室制备了血管上皮细胞特异性表达一氧化氮合成酶(eNOS)<sup>[14]</sup>和过氧化氢酶(Catalase)<sup>[15]</sup>的转基因猪, 研究者希望以此建立更接近于人的大动物模型, 进而来阐明一氧化氮和过氧化氢在心血管系统中的作用及在心血管疾病发生中所承担的角色。

### 2.3 糖尿病

多年以来, 研究者尝试选育出糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)的猪模型, 但是一直没有成功。近年有多篇报道用链脲佐菌素(streptozotocin)诱发猪糖尿病, 但是以基因修饰猪作为糖尿病研究模型显然更具有疾病机制和症状上的稳定性和相似性。

II 型糖尿病为非胰岛素依赖型糖尿病, 能引起多脏器病变, 是现代最为严重的慢性病之一, 有较为明显的家族史。诸多研究和全基因组关联分析(GWAS)都显示葡萄糖依赖性促胰岛素多肽受体 (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor, GIPR*) 基因和 GIP/GIPR 信号(GIP/GIPR axis)影响血糖水平及胰岛素应答<sup>[24]</sup>。*GIPR*-/-小鼠模型只显示了血糖耐受能力的轻微损害, 不能发展成糖尿病。而胰岛特异过表达显性抑制 *GIPR* 基因 (Dominant-negative *GIPR, GIPR<sup>dn</sup>*) 的转基因小鼠显示出早发性的糖尿病、胰岛结构的变化及  $\beta$  细胞的损失。为了进一步阐明 GIPR 信号通路在维持胰岛结构和功能中的作用, Remmer 等<sup>[19]</sup>以携带转基因的慢病毒注射受精胚胎, 制备了表达 *GIPR<sup>dn</sup>* 的转基因猪, 以大鼠 *Ins2* 启动子介导转基因在胰岛细胞中特异表达。11 周龄的 *GIPR<sup>dn</sup>* 转基因猪显示出口服葡萄糖耐量降低、胰岛素分泌下降, 但是静脉的血糖耐量还没有变化; 随着年龄增加, 到 11 个月龄时, 转基因猪静脉的血糖耐量也降低, 此时已检测不到胰岛素分泌。定量分析显示, 11 周时, 转基因猪胰岛  $\beta$  细胞量相比于对照还没有明显减少; 5 月龄转基因猪的胰岛  $\beta$  细胞量减少了 35%; 1—1.4 岁时减少了 58%, 此动态过程展示了 GIPR 信号在胰岛  $\beta$  细胞增殖中的重要作用。同时在 1—1.4 岁的转基因猪  $\beta$  细胞中观察到了显著增加的细胞凋亡。*GIPR<sup>dn</sup>* 转基因猪很好地模拟了人类 II 型糖尿病的疾病进程和病理表现, 并阐明了 GIP/GIPR 信号通路在  $\beta$  细胞增殖和功能发挥中所起的重要作用, 将为研究安全有效的药物和治疗手段, 以及开发胰岛细胞团的体内动态检测技术提供很好

的实验动物模型。

Umeyama 等<sup>[17]</sup>制备了胰岛  $\beta$  细胞过表达肝细胞核因子 1 $\alpha$ (*HNF-1 $\alpha$* )P291fsinsC 突变的转基因猪, 该突变基因也是一显性抑制基因, 为家族性早发 III 型糖尿病(Type III Maturity-onset Diabetes of the Young, MODY3)的致病基因。*HNF-1 $\alpha$*  转基因猪展示了持续的高血糖水平 (>200mg/dL), 相应地, 其体内的 1,5-AG (1,5-anhydroglucitol)水平也降低, 具有慢性高血糖特征。MODY3 并非胰岛素响应型糖尿病, 而是肾脏受损导致无法有效重吸收糖。同样, 在 *HNF-1 $\alpha$*  转基因猪中亦可观察到发育异常的肾脏和胰岛结构, 以及胰岛素分泌量的低下。

### 2.4 其他系统疾病

囊性纤维化(Cystic Fibrosis, CF)是白种人中最常见的致寿命缩短的遗传性疾病, 是由囊性纤维化跨膜传导调节因子(*CFTR*)的隐性突变造成的。*CFTR* 基因敲除小鼠模型已经建立, 却并不能发展出与人类类似的典型呼吸道、肠道和肝脏系统病变。寻求与人类接近的 CF 动物模型一直是研究者追求的目标。猪的呼吸系统与人类极为相似, 猪已被用于研究多种与 CF 类似的肺部病变, 包括各种感染和炎症。2008 年, Rogers 等<sup>[18]</sup>培育了 *CFTR* 的基因敲除猪, 研究用腺相关病毒(AAV)包装打靶载体, 利用 AAV 的高感染和整合效率来提高体细胞同源重组的效率。研究者以筛选得到的基因打靶细胞克隆进行体细胞核移植获得 *CFTR*+/-克隆猪, 再进行交配, 共计获得 20 只 *CFTR*-/-猪。新生猪出生后 24—40h 即可在其肠内发现胎粪肠梗阻。在 *CFTR*-/-猪的胰脏中可见较为严重的病理性损坏, 在肝脏部位可见局灶性胆汁性肝硬化病变和胆囊的损坏, 这些与人类患者的症状一致。但是随着年龄的增长, *CFTR*-/-猪并没有表现出与人类患者类似的呼吸系统障碍和肺部病变。此研究证实, 新生的 *CFTR*-/-胎猪与人类的 CF 新生儿在临床症状和病理变化上极为一致, *CFTR* 基因敲除猪将为研究和治疗 CF 提供新的研究平台。

视网膜色素变性(Retinitis Pigmentosa, RP)是造成青年人失明的主要原因之一, 全世界范围内的发病率约为 1/5000。RP 患者的视杆细胞在生命早期会逐渐变性并损失, 接下来数年甚至数十年, 视锥细胞也会慢慢损失, 最终丧失视觉功能。视紫红质基因 (*rhodopsin*) 的突变被认为是造成此病的罪魁祸首。虽然 *rhodopsin* 表达受限于视杆细胞中, 其遗传缺陷主要影响视杆细胞, 但是 RP 所造成的视觉障碍却主要是由于视锥细胞功能缺失所致。因此, *rhodopsin* 突变所致的视锥细胞长期的、慢性的变化才是研究者真正需要关注的。由于啮齿类动物的视网膜结构与人类差距较大, 小鼠模型往往不能很好地模拟此类疾病。二者的主要差别在于视网膜上的感光细胞(尤其是视锥细胞)的数量和分布。人类视网膜上含有丰富的视锥细胞, 主要集中于黄斑中央区; 而啮齿类的视网膜上视锥细胞较少, 并且分布平均。相比于小鼠, 猪的视网膜上具有富含视锥细胞的黄斑样中心区, 与人较为相似, 且视杆细胞与视锥细胞的比例与人类似。Petters 等<sup>[19]</sup>制备了视网膜特

异性表达突变 *rhodopsin* (Pro347Leu) 基因的转基因猪。与具有相同突变的 RP 患者一样, 这些猪在早期就表现出严重的视杆细胞损失, 视锥细胞在早期还相对损失较少, 但幸存的视锥细胞接下来会慢慢退化, 在 20 个月大的转基因猪中, 可观察到其视网膜只剩下单层的形态异常的视锥细胞。转基因猪在疾病表型和进程上都与 RP 患者具有强烈的相似性, 将为 RP 的研究和临床前试验治疗提供有价值的大型动物模型。该模型目前已得到了广泛应用, 并为建立其他遗传性失明动物模型打下了良好的基础。

Sommer 等建立了 Stargardt 黄斑营养不良 (stargardt-like macular dystrophy) 的疾病猪模型, 该疾病为由 *ELOVL4* 基因突变造成的显性眼科遗传病。以 *ELOVL4* 突变基因获得的转基因小鼠可以产生视网膜变性等病变, 并且转基因的表达量越高, 症状越严重。但是由于小鼠视网膜缺少黄斑区, 所以不能显示出本病最为明显的病理特征<sup>[25]</sup>。如上所述, 猪的视网膜结构与人极为相似, 可以作为良好的眼科遗传疾病模型。研究者建立了 *ELOVL4* 的 2 种突变基因的转基因猪 (*ELOVL4* 5 bpdel 和 Y270terEYFP), 以 Rho4.4 启动子启动 *ELOVL4* 的视网膜感光器特异性表达, 最后获得了 1 只 5 bpdel 转基因猪和 5 只 Y270terEYFP 转基因猪。研究显示, 突变的 *ELOVL4* 蛋白定位错误, 视网膜光感受器缺失, 感光细胞内外节部分解聚; 视网膜电图显示出转基因猪光感应缺失。转基因猪模型不仅进一步确定了 *ELOVL4* 与 Stargardt 病之间的直接联系, 而且建立了优于小鼠的转基因猪模型, 对于研究该类疾病的发病机制和开发有效的治疗策略具有重要意义。

### 3 结论

未来将会开发出更多的基因修饰猪疾病模型, 并将其应用于人类疾病的转化医学研究。而猪等大型动物基因修饰和胚胎操作技术的日益成熟也将推动基因修饰猪在生物医学各领域的深入应用。当然, 在看到猪作为实验动物模型的种种优势之外, 还需对其目前存在的缺陷和不足加以关注。

(1) 猪品种繁多, 种群资源丰富, 但是目前用做实验动物的猪遗传背景和表型尚不稳定, 近交系培育开展得更少。美国 Yucatan 小型猪有过一定程度的近交培育, 近交系数仅为 0.25—0.37。中国云南农业大学对本地版纳微型猪进行了长达 30 多年的近交繁育, 目前已具有一定规模的种群, 但尚未形成完全稳定的遗传性状, 具体基因背景和近交程度未见详细文献报道。由此可见猪的近交培育相当困难。目前常用的实验猪种群多为一定范围内的封闭群, 遗传背景复杂且缺乏统一性, 这限制了其作为实验动物的应用。

(2) 猪作为实验动物缺乏标准化。标准化的饲养和管理、SPF 级甚至无菌级实验猪的培育、大型动物生物安全标准的制定任重而道远。

(3) 猪相关实验技术和设备的开发。如猪的生理、解剖、代谢等实验数据还不够全面, 相关实验操作需进一步完善和标准化。特别是目前针对猪行为学的研究稀少, 而行为学研

究对疾病表型的鉴定、病程的发展具有极为重要的作用。中国科学院再生生物学重点实验室也将对猪的行为学开展初步研究。

当前, 以基因修饰猪作为疾病模型的研究还不是很多, 除了文中提到的一些疾病领域外, 未来基因修饰猪将在更多的领域得到广泛应用, 如罕见遗传病、癌症、干细胞和再生医学研究等。另外, 标记基因 (如绿色荧光蛋白, *EGFP*) 的转基因猪在疾病模型的研究中也具有重要作用, 如在特定组织或细胞表达标记基因可以较为方便地观测该类细胞在疾病过程中的变化, 抑或研究药物或治疗对靶向细胞或组织的效果。免疫缺陷猪的开发也是今后研究的重点之一, 将应用于研究癌症、干细胞治疗或其他细胞移植治疗。基因修饰猪作为人类疾病模型实验动物的研究, 将为人类疾病的研究带来新的视野, 也将给疾病的预防、诊断和治疗带来深刻的革命。

### 参考文献 (References)

- [1] Prather R S, Hawley R J, Carter D B, *et al.* Transgenic swine for biomedicine and agriculture[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 115–123.
- [2] Misra R P, Duncan S A. Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination [J]. *Endocrine*, 2002, 19(3): 229–238.
- [3] Dinnyés A, De Sousa P, King T, *et al.* Somatic cell nuclear transfer: Recent progress and challenges[J]. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(1): 81–90.
- [4] Wheeler M B, Walters E M. Transgenic technology and applications in swine[J]. *Theriogenology*, 2001, 56(8): 1345–1369.
- [5] Wang B, Zhou J. Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 103.
- [6] Cathomen T, Joung J K. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1200–1207.
- [7] Rémy S, Tesson L, Ménoret S, *et al.* Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals [J]. *Transgenic Res*, 2010, 19(3): 363–371.
- [8] Miller J C, Tan S, Qiao G, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [9] Yang D, Yang H, Li W, *et al.* Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning[J]. *Cell Res*, 2011, 21(6): 979–982.
- [10] Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, *et al.* Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection [J]. *Transgenic Res*, 2001, 10(6): 577–582.
- [11] Yang D, Wang C E, Zhao B, *et al.* Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20): 3983–3994.
- [12] Kragh P M, Nielsen A L, Li J, *et al.* Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw[J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(4): 545–558.
- [13] Lorson M A, Spate L D, Samuel M S, *et al.* Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in pigs using ssDNA [J]. *Transgenic Res*, 2011, In press, doi: 10.1007/s11248-011-9496-8.
- [14] Hao Y H, Yong H Y, Murphy C N, *et al.* Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets[J]. *Transgenic Res*,

- 2006, 15(6): 739-750.
- [15] Whyte J J, Samuel M, Mahan E, *et al.* Vascular endothelium-specific overexpression of human catalase in cloned pigs [J]. *Transgenic Res*, 2011, 20(5): 989-1001.
- [16] Renner S, Fehlings C, Herbach N, *et al.* Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function [J]. *Diabetes*, 2010, 59(5): 1228-1238.
- [17] Umeyama K, Watanabe M, Saito H, *et al.* Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 697-706.
- [18] Rogers C S, Stoltz D A, Meyerholz D K, *et al.* Disruption of the *CFTR* gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs [J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1837-1841.
- [19] Petters R M, Alexander C A, Wells K D, *et al.* Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(10): 965-970.
- [20] Kraft T W, Allen D, Petters R M, *et al.* Altered light responses of single rod photoreceptors in transgenic pigs expressing P347L or P347S rhodopsin [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 1246-1256.
- [21] Sommer J R, Estrada J L, Collins E B, *et al.* Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for Stargardt-like macular degeneration [J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, In press, doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300417.
- [22] Nissen S E, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(24): 2457-2471.
- [23] Kahn B B, McGraw T E. Rosiglitazone, PPAR $\gamma$ , and type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(27): 2667-2669.
- [24] Saxena R, Hivert M F, Langenberg C, *et al.* Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(2): 142-148.
- [25] Karan G, Lillo C, Yang Z, *et al.* Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: A model for macular degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(11): 4164-4169.

(责任编辑 孙秀云)

· 学术动态 ·



## “第七届国际电力电子与运动控制会议”征文

由中国电工技术学会(CES)、国际电气与电子工程师协会(IEEE)电力电子学会(PELS)和中国国家自然科学基金委员会(NSFC)主办的第七届国际电力电子与运动控制会议将于2012年6月2—5日在哈尔滨召开。

**征文范围:** 器件、封装和系统集成, 功率集成电路, 功率半导体器件, 无源元件, 热分析、封装和系统集成; 率变换器及其控制, DC/DC、DC/AC、AC/AC、AC/DC 及多电平变换器, 功率因数校正及谐波抑制, 调制和控制策略, 电力电子系统 EMI 抑制; 驱动及运动控制, 感应电机驱动, 永磁电机驱动, 同步磁阻电机驱动, 直线电机驱动, 无传感器控制, 特种电机、驱动器和传感器, 电机驱动系统应用; 源和智能电网技术, 新能源及替代系统(如太阳能、风能、海洋能、燃料电池等)与应用接口专题, 能系统, 网及分布式发电, 能电网控制、通信及监测; 推进系统, 电动和混合动力车、舰船, 电源和电动汽车充电器, 电池建模及管理系统, 汽车电子; 能质量管理, 电能质量分析及改善, 静态并联补偿静态串联补偿, 串并联补偿; 其他电力电子应用, 不间断电源, 感应加热, 电力电子及驱动在家用电器中的应用, 电力电子及驱动在 LEDs&HIDs 中的应用等。

论文截稿日期: 2012年2月10日。

联系电话: 0451-86413420。

电子信箱: ipemc2012@163.com。

会议网站: <http://www.ipemc2012.org/>。