

陆新章,张梅,娄颜坤,等.利用基因编辑技术进行猪异种器官移植及人类疾病模型研究的进展[J].上海农业学报,2021,37(1):136-144.

## 利用基因编辑技术进行猪异种器官移植 及人类疾病模型研究的进展

陆新章<sup>1</sup>,张梅<sup>2</sup>,娄颜坤<sup>2</sup>,马育芳<sup>2</sup>,李大力<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>上海市农业科学院,上海201403;<sup>2</sup>上海市调控生物学重点实验室,华东师范大学生命科学学院生命医学研究所,上海200241)

**摘要:**采用不断发展的基因编辑技术,近年来对猪的基因组改造不仅构建出涵盖心血管疾病、神经退行性疾病、新陈代谢疾病、癌症、免疫缺陷等各方面的人类疾病模型,而且通过对猪进行基因编辑实现了降低异种移植免疫排斥、敲除猪内源性逆转录病毒以及生产嵌合体动物等,使猪异种器官移植的应用更前进了一步。综述梳理基因编辑技术,尤其是CRISPR/Cas9技术在异种器官移植及人类疾病模型构建方面的研究进展。

**关键词:**猪;基因编辑;CRISPR/Cas9;异种器官移植;疾病模型

**中图分类号:**S828;Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-3924(2021)01-136-09

## Genome editing technologies for xenotransplantation and disease model in pigs

LU Xinzhang<sup>1</sup>,ZHANG Mei<sup>2</sup>,LOU Yankun<sup>2</sup>,MA Yufang<sup>2</sup>,LI Dali<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Academy of Agricultural Sciences,Shanghai 201403,China;<sup>2</sup>Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology;Institute of Biomedical Sciences,School of Life Sciences,East China Normal University,Shanghai 200241,China)

**Abstract:** With the usage of the recently developed genome editing technologies, extensive predetermined modifications have been incorporated into the pig genome, not only to build a variety of human disease models, covering cardiovascular disease, neurodegenerative disease, metabolic disease, cancer, immune deficiency and other aspects, but also to make the application of pig xenotransplantation a step further by reducing the immune rejection of xenotransplantation, knock-out of the porcine endogenous retroviruses (PERVs), as well as production of chimeric animals. In this review, we provide a brief introduction of pig genome editing and the related progress, especially for CRISPR/Cas9 technology, with regard to the xenotransplantation and disease model areas.

**Key words:** Pig; Genome editing; CRISPR/Cas9; Xenotransplantation; Disease model

猪作为一种重要的模式动物,具有其他模式动物无法比拟的优点。相对于应用最为广泛的鼠类,猪在器官大小、解剖、生理、新陈代谢、神经生物学和基因组等方面和人类具有很高的相似性,从而能够更加精确地模拟许多人类疾病的表型<sup>[1]</sup>;猪疾病模型的合适尺寸以及长寿命还有助于在临床条件下进行手术操作,并且在临床相关时间范围内对治疗药物进行长期跟踪和评估。而与人类相似度更高的灵长类动物相比,猪产仔量多、后代生长快,因此仅需要较低的维持成本,也不容易引发伦理问题。基于此,猪在构建人类疾病模型、生产人类药用蛋白和器官移植等方面有着巨大的应用空间。

出于这些研究目的,科学家们采用基因打靶等技术对猪进行特异的遗传改造。然而,由于缺乏胚胎干细胞,科学家们需要在体细胞中通过同源重组引入靶向修饰,再通过体细胞核移植生产转基因猪。大动物体细胞中同源重组的效率极低,因此传统的基因打靶往往只能引入杂合突变,具有纯合突变的动物

需要通过后续连续打靶或者几轮育种步骤获得。这些操作费时费力且造价昂贵,在很大程度上限制了该领域的发展。

直到人工内切核酸酶的出现,它不仅显著提高了打靶效率,还能够通过在受精卵或者体细胞中直接注射工程化内切核酸酶,在胚胎发生过程中同时突变多个基因<sup>[2]</sup>。这使得以往制备基因敲除动物低效、技术难度大等缺点得到了彻底的改变,同时标志着基因定点敲除进入了基因组编辑的时代。

## 1 基因组编辑

基因组编辑是指通过人工核酸内切酶介导的基因组定点修饰技术。其原理是通过人工核酸内切酶在靶位点切断 DNA,产生 DNA 双链断裂(Double-strand break, DSB),进而诱导细胞内的 DNA 修复系统进行非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)和同源重组修复(Homologous recombination, HR),进而实现在基因特定位点的基因敲除(通过 NHEJ)或者敲入(通过 HR)<sup>[3]</sup>。

最早出现的人工核酸内切酶包括锌指核酸酶(Zinc-Finger Nucleases, ZFNs)<sup>[4]</sup>和转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)<sup>[5]</sup>。ZFNs 和 TALENs 具有类似的结构,都是由以模块形式构建的序列特异的 DNA 结合结构域(ZFNs 为锌指蛋白,TALENs 为 TALE 蛋白)与 DNA 核酸内切酶 FokI 组成。在具体操作中,通过设计不同的蛋白模块对目标序列进行识别,并引导 FokI 核酸内切酶在该区域切断 DNA,形成双链切口。高效的打靶效率促进了 ZFNs 和 TALENs 技术的广泛应用。采用这两种技术,科学家们已经在多个物种中实现了对基因组的精细修饰<sup>[6]</sup>。

2012 年,一种基于细菌和古细菌靶向切割外源 DNA 的防御机制改造而来的全新的人工核酸内切酶——成簇规律间隔短回文重复/CRISPR 相关蛋白 9(Clustered regularly inter-spaced short palindromic repeats/Cas9, CRISPR/Cas9)系统出现<sup>[7]</sup>。该系统使用 Cas9 核酸酶和短引导 RNA(gRNA)的组合来靶向特定的 DNA 序列以进行切割。位于 PAM 序列(NGG)5' 端的与目标 DNA 互补的 20 个核苷酸的 gRNA,将 Cas9 引导至靶 DNA 并介导双链 DNA 的切割以形成 DSB<sup>[8]</sup>。介于此,CRISPR/Cas9 可以在任何 N20-NGG 位点实现基因打靶。通过对该系统的不断优化,CRISPR/Cas9 已经适用于精确 DNA/RNA 打靶,在哺乳动物细胞和胚胎中显示出很高的效率。与 ZFNs 和 TALENs 相比,CRISPR/Cas9 系统更易于构建,所需时间和成本也大幅降低。这些特性都赋予了 CRISPR/Cas9 系统更高的灵活性和适用性,从而显著推动了生物医学和农业等许多领域的研究进展。

## 2 基因修饰猪克服猪器官移植问题的研究进展

大量可移植器官的替代研究是目前医学上亟待解决的难题。创造具有靶向遗传修饰猪的推动之一来自于解决移植到人类的器官极其短缺的需要。目前普遍认为,猪的器官和人的器官在大小和功能上均有非常相似的地方,并且可以大量获取,所以猪的器官被认为是异种器官移植最好的来源。然而,由于先天免疫和获得性免疫的激活、炎症反应、凝血系统紊乱,以及猪器官本身携带病毒的危害性等问题,使得猪器官移植到人体的临床应用举步维艰。为了缓解器官供应不足的现状,解决猪器官移植风险的难题,近些年来研究人员应用基因编辑技术做出了巨大的努力,使得猪器官移植迈上了新的台阶。尽管这些猪在临床前非人、灵长类动物模型中作为供体的研究还非常有限,在细胞水平的体外分析结果已为克服异种器官移植中的障碍带来了无限希望。

### 2.1 对猪进行基因编辑以降低异种移植免疫排斥

供体和受体之间的高免疫不相容性是异种移植的主要障碍。异种移植的免疫障碍主要包括超急性排斥、延迟异种移植排斥、急性细胞排斥和慢性排斥等<sup>[9]</sup>。宿主通常通过超急性免疫排斥在数分钟或数小时内破坏异种植物,导致移植失败。研究人员发现猪器官的血管内皮细胞存在大量的半乳糖  $\alpha 1,3$ -半乳糖(Gal $\alpha 1,3$ -Gal)抗原,会被人免疫系统产生的抗半乳糖  $\alpha 1,3$  半乳糖抗体所识别而产生免疫排斥。Gal $\alpha 1,3$ -Gal 的合成由  $\alpha 1,3$ -半乳糖苷转移酶(GGTA1)催化,该酶存在于猪中但在人体中不存在。虽然有研究人员通过静脉注射适量的寡聚糖来减少抗体的含量,但是这样的方法却是收效甚微。基因编辑技术的出现和发展使得从根本上解决免疫排斥的问题向前跨了一大步。

早在 2002 年,Dai<sup>[10]</sup>和 Lai 等<sup>[11]</sup>使用同源重组获得了具有杂合敲除 GGTA1 的猪,并通过进一步筛选

来自杂合猪的纯合敲除细胞来生产纯合 GGTA1 敲除 (GTKO) 仔猪<sup>[12-13]</sup>。将 GTKO 猪的心脏移植到免疫抑制的狒狒体中,异种移植物存活期最长达 179 d<sup>[14]</sup>。GTKO 猪的产生表明超急性异种移植物排斥已在很大程度上得到克服。通过使用基因组编辑工具,研究者们又先后建立了一系列具有不同遗传背景的 GTKO 猪。此外,科学家还鉴定出其他能够引起超急性免疫排斥的异种反应性抗原,包括由胞苷一磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶(CMAH)催化的 Neu5Gc 抗原(N-羟乙酰神经氨酸)和由  $\beta 1,4$ -乙酰半乳糖胺基转移酶(B4GALNT2)产生的聚糖<sup>[15-16]</sup>,相应的具有双重(GGTA1/ CMAH)和三重(GGTA1/ CMAH/ B4GALNT2)基因失活的转基因猪也已成功获得,通过移植实验显示相较于 GTKO 猪其免疫排斥表现出进一步的降低<sup>[17-18]</sup>。

除此之外,研究者们还对猪进行了许多其他单转基因或组合转基因遗传修饰,包括 CD46、CD55、CD59、CD39、Thrombomodulin、Hemeoxygenase 1、A20、HLA-E 以及 CD47 等,以达到抑制补体活性、延迟异种移植排斥或/和急性细胞排斥的目的<sup>[19]</sup>。在多组不同转基因背景的“器官猪”移植(受体为非人类灵长类动物)研究中,异种移植物存活时间最长被延至 945 d<sup>[20]</sup>。在这个过程中,虽然对猪的转基因改造起到了去除免疫抗原的作用,通过免疫抑制药物的使用来降低受体对移植物的排斥同样不可或缺。在没有持续免疫抑制的情况下,长期的异种移植物存活仍然难以实现。为了解决这个问题,Nottle 等<sup>[21]</sup>尝试采用具有更高保真度的 FokI-dCas9 将编码抗 CD2 单克隆抗体(mAb)的 7.1 kb 转基因整合到 GGTA1 位点中,通过在引入免疫调节分子的同时消除与超急性排斥相关的基因,生产出第一例用于异种移植的基因敲入猪。经检测,这些猪均发生了预期的 aGal 的缺失,同时在血清中表达对人和非人灵长类 CD2 特异但不结合猪 T 细胞的 mAb。虽然作者尚未证实 CD2 mAb 的敲入是否能够为猪异种移植物提供局部免疫保护,但这无疑为生产具有更高免疫抑制性的异种器官移植供体提供了一条新思路。Reyes 等<sup>[22]</sup>则获得了 I 类 MHC 基因敲除猪,可作为研究异种移植物排斥的重要材料。I 类 MHC,又称为猪白细胞抗原(Swine Leukocyte Antigens,SLA),对免疫系统在健康和疾病中的作用至关重要,尤其在感染和移植排斥方面。通过 CRISPR/Cas9 技术生产的克隆猪表现出细胞表面 I 类 MHC 蛋白的完全丧失,同时外周血中 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞水平有所降低。

## 2.2 敲除猪内源性逆转录病毒

在猪器官移植研究上另一个受关注的问题,就是猪器官所携带的病毒和微生物对移植宿主存在潜在的危害性。比如巨细胞病毒、EB 病毒,甚至有时候猪器官也可能携带 HIV、西尼罗病毒或是狂犬病毒,移植到宿主后会使得宿主感染并传播相应的病毒。当然,这一些病毒都可以通过改善猪的饲养条件,定期做相应安全监测等措施来缓解,避免或是完全消除移植的猪器官携带相应的病毒。然而,和人体内存在一些非致病性内源性逆转录病毒一样,猪体内同样存在一些猪内源性逆转录病毒(PERVs)。这是一种无活性的内源性逆转录病毒,是猪基因组的组成部分,对猪本身并无危害,却可能会被某些因素或环境变化重新激活,具有在受体中变得具有致病性和感染性的可能。由于 PERV 整合在基因组多个位置,无论是采用 RNA 干涉、ZFN 或者 TALEN 技术,同时完全消除猪基因组中的所有 PERV 都难度巨大。随着 CRISPR/Cas9 技术的出现,科学家通过设计靶向 sgRNA 在永生猪细胞系 PK15 中同时敲除了所有 62 个拷贝的 PERV 基因,同时证明了 PERV 向人细胞传递的减少超过 1 000 倍<sup>[23]</sup>。在后续的研究中,该团队采用体细胞核移植技术构建出 PERV 灭活转基因猪,成功破解了 PERV 跨物种传播给异种器官移植所带来的安全问题<sup>[24]</sup>。此外,CRISPR 工具同时靶向数十个基因组位点的强大能力为创造具有复杂修饰的动物提供了无限可能。

## 2.3 嵌合体动物

除了对猪进行遗传修饰以作为器官供体之外,科学家们还尝试采用异种生成(Xeno-generation)技术(即在猪中生长人体器官)来缓解器官短缺的矛盾。与直接修饰猪作为器官供体相比,异种生成采用跨种囊胚互补(Interspecies blastocyst complementation),结合人源供体多能干细胞和器官生成障碍受体猪,允许在靶器官中富集供体细胞以形成携带人源化靶器官的嵌合动物,并最终可用于移植<sup>[25]</sup>。Matsunari 等<sup>[26]</sup>证明了在猪中使用囊胚互补产生同基因器官的可行性。通过在 Pdx1-Hes1 胰腺发育障碍猪克隆囊胚中注入正常猪胚胎的卵裂球,生产出的猪具有正常构型和功能的胰腺,并能够存活至成年。Wu 等<sup>[27]</sup>报道了一种种间嵌合体,人类多能干细胞可以在猪胚胎中整合和分化,这是向异种器官生成迈出的一大步。获

得器官生成障碍的受体是使用这项技术的关键之一。当鉴定出控制靶器官发育的基因时,就可以通过基因组编辑简单地实现器官发生障碍的猪。Wu 等<sup>[28]</sup>和 Wang 等<sup>[29]</sup>采用 CRISPR/ Cas9 技术分别敲除 PDX1 和 SIX1/SIX4 基因来抑制猪的胰腺和肾脏的发育,为在猪中实现人体器官的发生创造了合适的平台。

Yang 等<sup>[30]</sup>采用 CRISPR 结合体细胞核移植技术生产出表达人胰岛素的转基因猪。科学家们期望来源于该种 INS-人源化猪的胰岛素对于治疗糖尿病患者具有更好的效果,同时也将提供更理想的异种胰岛来源以克服由猪和人之间的胰岛素差异引起的风险。

### 3 人类疾病模型猪的构建

基因组编辑技术自发现至今已经广泛且深入地促进了猪作为人类疾病模型的应用。虽然科学家们利用传统的转基因技术(包括原核注射、精子介导的基因转移、基因打靶等)已经创造出多种疾病模型,然而使用基因组编辑工具,编辑效率不仅有了很高的提升,基因组变化也能够从单等位基因直接扩展到多个基因,从而为类似于人类的大型动物模型中的复杂多基因遗传疾病的模拟和破译铺平了道路。

#### 3.1 心血管疾病

心血管疾病是全球范围内造成死亡和残疾的头号病因。作为最常用的模式生物,小鼠已经帮助科学家们在心血管疾病研究领域取得了很大进展。然而小鼠心脏和人类差异巨大,通常不能准确地模拟人类心血管系统的生理学和病理学。相比之下,猪的心脏在解剖结构、血管系统、胆固醇代谢方式等方面和人都极其相似,在猪体内模拟人类相关心血管疾病的发生和疾病治疗具有更实际的意义。

动脉粥样硬化是心血管疾病的罪魁祸首,主要是由 LDL 受体基因(LDLR)中发生功能丧失性突变或编码载脂蛋白 B(APOB)的基因突变引起。使用传统同源重组生产的 LDLR 敲除猪已被证实具有明显的模型效果,使科学家们能够在短时间内模拟人类家族性高胆固醇血症和动脉粥样硬化的发生,以及进行药物或者治疗方法的临床前评估。2012 年,Carlson 等<sup>[31]</sup>报道了 TALEN 技术介导的 LDLR 基因敲除猪的获得,打靶效率较传统基因敲除技术有了大幅提升(针对不同目的基因的单等位和双等位基因敲除效率最高达 54% 和 17%)。近期,通过使用 CRISPR/ Cas9 技术,Huang 等<sup>[32]</sup>在广西 Bama 小型猪中成功将 ApoE 和 LDLR 同时敲除。这些猪在早期(2 月龄)即开始出现并维持与动脉粥样硬化相关的异常脂质代谢,LDL 胆固醇、总胆固醇以及载脂蛋白 E 水平均出现显著升高。

采用基因编辑技术,科学家们还创建出其他心血管疾病相关基因的转基因猪模型。噻唑烷二酮(TZD)是一类用于治疗二型糖尿病的药物,能够介导 PPAR $\gamma$  受体的活化。PPAR- $\gamma$  受体是配体激活的核转录因子,通过调节基因表达来增加外周组织中的胰岛素敏感性,进而降低血糖。但在实际治疗过程中,有报道 TZD 具有显著增加糖尿病患者心血管不良反应的风险。Yang 等<sup>[33]</sup>通过 ZFN 技术构建出了 PPAR $\gamma$  杂合敲除体细胞克隆猪,以期用来研究 PPAR $\gamma$  基因在心血管疾病中的具体功能。NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1)是一个在膳食胆固醇吸收和胆汁胆固醇重吸收中起关键作用的基因。Wang 等<sup>[34]</sup>通过向早期胚胎中共注射 cas9 mRNA 和 sgRNA,获得 Npc1l1 基因敲除 Bama 小型猪,用于研究 Npc1l1 基因在心血管和代谢疾病的发生中的作用。

#### 3.2 神经退行性疾病

神经退行性疾病越来越成为老年化人群中常见的一类疾病,严重影响了老年人群的生活质量甚至生命健康。利用具有相应遗传修饰的转基因猪可以协助科学家们了解此类疾病的病理发生发展,从而解决目前神经退行性疾病治疗方法及其匮乏的窘境。

帕金森病(PD)是第二大类神经退行性疾病,临床表现包括运动功能障碍,如运动迟缓、静止性震颤、僵硬和体位不稳,还伴有自主神经功能和认知障碍等。在多种类型的帕金森病例中,大约 10% 已被确认是由单基因控制,包括 SCNA、LRRK2、Parkin、Pink1、DJ-1 等<sup>[35]</sup>。Yao 等<sup>[36]</sup>通过将 DJ-1 特异的 TALENs 和一条单链寡核苷酸共转染大白猪成纤维细胞,成功地将该短片段插入 DJ-1 位点,再经体细胞核移植获得 DJ-1 基因敲除的转基因猪。Western blot 结果显示基因敲除猪中 DJ-1 基因的表达被成功破坏。Zhou 等<sup>[37]</sup>报道了使用 CRISPR/Cas9 技术通过一步转染和核移植获得 PARK2 和 PINK1 纯合双敲猪模型,敲除效率高达 38.1%。免疫荧光检测显示克隆猪的大脑中并无 Pink1 和 Parkin 蛋白的表达。Wang 等<sup>[38]</sup>通过共注射 Cas9 mRNA 和分别靶向 Parkin、DJ-1 和 PINK1 基因的混合 sgRNAs 至一细胞期广西 Bama 小型猪

胚胎中,成功将这三个 PD 相关基因同时敲除。近期,Zhu 等<sup>[39]</sup>采用 Crispr/Cas9 技术,成功在广西 Bama 小型猪中引入了三个导致遗传性 PD 的  $\alpha$ -突触核蛋白(SCAN)基因的错义单等位基因突变(E46K,H50Q 和 G51D)。DNA 测序确认这些小型猪在转录水平表达了突变形式的  $\alpha$ -突触核蛋白。虽然在这几个帕金森疾病模型猪中暂时都未发现 PD 相关的表型变化,考虑到 PD 是一种进行性疾病,人类平均发病年龄约为 60 岁,研究者们预计这些猪会在生长晚期逐渐出现疾病特征。

亨廷顿氏病(HD)是一种致命的常染色体显性遗传性神经退行性疾病,由亨廷顿蛋白(HTT)单基因突变引起。HTT 基因的外显子 1 中的 CAG 重复增加(>36 个 CAG)导致一种异常的多聚谷氨酰胺(polyQ)重复,导致 HTT 在脑中错误折叠和聚集。Yan 等<sup>[40]</sup>报道了人亨廷顿蛋白(HTT)敲入猪作为亨廷顿病模型。研究者利用 CRISPR/ Cas9 技术将含有 150-CAG 重复的人 HTT 外显子 1 替换了含有 18 个 CAG 重复的猪 HTT 外显子 1。与年龄和性别匹配的野生型猪相比,克隆的 HTT 敲入猪显示较少的体重增加以及 HD 样症状,包括通常在 HD 患者中观察到的运动功能和呼吸困难。形态学分析显示,转基因猪在脑部具有显著的神经元退行性特征,纹状体带刺神经元明显退化,很好的模拟了人类亨廷顿氏病的病理特征,为亨廷顿氏病的病理研究和治疗提供了良好的模型基础。

### 3.3 新陈代谢疾病

糖尿病(Diabetes mellitus,DM)是全世界范围内最常见的慢性代谢疾病。其特征不在于葡萄糖稳态失衡,具体表现为高血糖水平、多尿、烦渴和体重减轻等。长期血糖异常还容易引发多种严重并发症,如心血管疾病、糖尿病视网膜病变、肾病和神经病变等,进而导致大量器官衰竭,对人体健康危害极大。

猪是研究人类糖尿病理想的动物模型:两者都属于杂食类生物;猪胰腺在大小、形状和血液供应方面类似于人胰腺,猪的内分泌细胞类型与胰岛大小和比例也与人类相近。临床上,糖尿病是由胰岛  $\beta$  细胞的胰岛素产生或者分泌的异常,或者血液循环中的胰岛素的敏感性降低而引起。Cho 等<sup>[41]</sup>采用 CRISPR/ Cas9 技术成功获得了胰岛素基因(INS)敲除体细胞核移植猪。由于完全缺失了胰腺胰岛素的表达,INS 敲除仔猪表现出预期的高血糖水平,同时在尿液中检测到葡萄糖;喂食后,猪血清中的胰岛素和 c-肽水平保持不变。胰岛素缺失猪模型对于糖尿病研究中的诸多领域,例如胰岛细胞移植、新药有效性以及安全性测试等是非常珍贵的材料。Sheets 等<sup>[42]</sup>利用 CRISPR/ Cas9 技术率先在猪中敲除了胰岛素信号转导负调节基因 GRB10(Growth-hormone receptor binding protein-10)。生长激素受体结合蛋白 10(GBR10)是一种 adaptor 蛋白,能够结合并直接抑制胰岛素样生长因子 1/2 和胰岛素受体,从而实现了对胰岛素信号转导的负调节功能。在小鼠中,基因敲除和过表达研究都证实了 GBR10 作为生长抑制因子的作用。然而,由于小鼠和人类之间 GRB10 基因的印记状态存在差异,因此 GRB10 基因敲除猪对于研究该基因在糖尿病中对胰岛素抵抗和肥胖的作用具有更实际的意义。

对于糖尿病的治疗,将体外分化的胚胎干细胞、诱导多能干细胞以及能够产生功能性胰岛素的原代细胞诱导成具有正常功能的  $\beta$  细胞进行替代治疗给糖尿病患者带来了新的希望。完全了解胰腺发育过程中调节因子的功能是控制体外分化过程中发育程序的关键,对于产生功能性  $\beta$  细胞至关重要。通过在小鼠中进行基因敲除的研究,科学家们发现 PDX-1、NGN3 等基因与胰腺的发育以及功能至关重要<sup>[43]</sup>。NEUROGENIN 3(NGN3)基因敲除小鼠表现为内分泌腺发育的丧失。人胰腺内分泌发育的研究中,也有多项证据支持 NGN3 在人类胎儿祖细胞的细胞重编程、细胞分化和维持中的作用。然而,Jennings 等<sup>[44]</sup>还同时阐明了人类和小鼠胰腺发育之间存在差异,特别是 Ngn3 的时间表达模式需要在猪等生理上和系统发育上更接近人类的非啮齿动物模型中进行研究。Sheets 等<sup>[45]</sup>将靶向 NGN3 的 Cas9 核糖核蛋白注入体内培养的猪胚胎中,成功获得三头 NGN3 基因敲除猪。初生仔猪能够接受初乳和正常哺乳,但在 24—36 h 内经历了极端的体重减轻,胰岛素、胰高血糖素和生长抑素等胰腺内分泌激素均无表达,从而支持了 NGN3 在猪内分泌腺发育中的关键作用。PDX-1 是胎儿期胰腺发育的关键基因。在小鼠中,完全缺失 PDX-1 导致胰腺发育不全,而 PDX-1 单等位基因失活的小鼠虽然能形成胰腺,胰腺  $\beta$ -细胞的胰岛素分泌却显著减少,该结果与 2 型糖尿病患者的症状类似。此外还有报道某些 2 型糖尿病患者携带 PDX-1 突变。因此,PDX-1 杂合缺失猪可作为 2 型糖尿病理想的实验模型。Tanihara 等<sup>[46]</sup>探索了一种新的方法,将 Cas9 蛋白和靶向 PDX-1 基因的 sgRNA 通过电转染的方法转入猪胚胎中,获得的囊胚打靶效率最高达 94.1%。

Laron 综合征是一种比较罕见的常染色体代谢类疾病,主要特征包括身材矮小、额叶突起、小中面、中

度肥胖等,患者通常表现出极高水平的循环生长激素(GH)和严重的胰岛素样生长因子 I(IGF-I)缺乏。造成 Laron 综合征的病因在于生长激素受体(GHR)的突变:大多数 Laron 患者中发现的突变发生在 GHR 蛋白的细胞外结构域,导致其无法与 GH 结合;其他突变则会导致信号转导的功能丧失。迄今为止,Laron 综合征只能通过重组 IGF-I 进行治疗,但是会给患者带来多种副作用,包括低血糖、胸腺肥大、低血压等。

为了对 Laron 综合征的发病机制进行深入研究,进而开发新的治疗策略,科学家们在鸡和小鼠中构建了相应的疾病模型,在一定程度上表现出了相应的疾病特征。然而由于 Laron 综合征属于代谢类疾病,又有不同的课题组先后在与人类激素代谢通路更为接近的猪中对其进行了研究。采用 ZFN 和 CRISPR/Cas9 技术获得的 GHR 基因敲除个体均表现出与 Laron 综合征相一致的表型:IGF-1 水平显著降低、血清 GH 水平显著升高、(发育一段时间后)个体体型和体重明显偏低,同时还伴有低血糖、脂肪含量增多等<sup>[47-48]</sup>,为该疾病的病理研究以及进一步评估患者健康状况和预期寿命提供了理想的素材。

### 3.4 癌症

近几十年来,人类对癌症的理解取得了革命性的进展,许多癌症的分子机制通过小鼠模型被阐明。其中获得性突变是癌症的最常见原因,基因组的不稳定性、原癌基因的激活和抑癌基因的失活都可导致不同类型的癌症。Wang 等<sup>[49]</sup>通过 CRISPR/Cas9 介导的基因敲入建立了具有 Cre 依赖性诱导型 Cas9 表达猪,以实现组织和时间特异性方式诱导肿瘤发生的目的。在该研究中,为了模拟非小细胞肺癌(NSCLC)致癌融合基因 EML4-ALK,两种靶向 EML4 和 ALK 的 gRNA 通过慢病毒被引入猪成纤维细胞中,再经由 CRISPR/Cas9 介导的基因组倒位即能够产生具有致癌 EML4-ALK 融合基因的成纤维细胞。此外,该研究还通过鼻内递送靶向肿瘤抑制基因 TP53、PTEN、APC、BRCA1 和 BRCA2 以及癌基因 KRAS 的多重 gRNA 检验了体内诱导肺癌的可行性。gRNA 给药 3 个月后,Cre 依赖性 Cas9 表达猪出现肺病的迹象,肺组织的形态学分析显示出与人类腺癌相似的病理特征。

TP53(编码 p53)是重要的肿瘤抑制基因,其在保护细胞免于致癌转化中发挥重要作用,是癌症中最常见的突变基因之一。Shen 等<sup>[50]</sup>采用 TALENs 技术获得了 P53 基因敲除猪,该基因 mRNA 的表达在各组织中均显著降低。共聚焦显微镜和 Western Blotting 分析进一步表明,P53 双等位基因敲除猪的成纤维细胞在介导 DNA 损伤修复方面存在缺陷。近期,Tanihara 等<sup>[51]</sup>报道通过基因编辑引起的突变成功诱导了 TP53 嵌合和双等位基因突变猪的肿瘤表型。在这项研究中,靶向 TP53 外显子 3 和内含子 4 的 sgRNA 连同 Cas9 蛋白通过电转染的方式被转入受精卵中。在 9 头出生存活的仔猪中,6 只携带 TP53 突变(2 只发生双等位基因突变,剩余 4 头为单等位基因突变)。对这些基因敲除猪连续监测 16 个月后,三头(50%)表现出不同的肿瘤表型:两头双等位基因突变猪发展出下颌骨肉瘤和肾母细胞瘤;在两个 sgRNA 靶位点均出现缺失的单等位基因突变猪则表现出恶性纤维组织细胞瘤。

除了这两例在体内成功诱导肿瘤的转基因猪模型之外,其他课题组还先后生产出了敲除 APC 基因(结肠癌相关)<sup>[52]</sup>、MITF 基因(黑色素瘤相关)<sup>[53]</sup>以及 RUNX3 基因(胃癌相关)<sup>[54]</sup>的基因编辑转基因猪。这些动物的致癌表型还需要进一步的观察和研究。

### 3.5 免疫缺陷

具有严重联合免疫缺陷(Severe Combined Immunodeficient, SCID)的动物不仅能够模拟人类疾病,还能成为癌症、干细胞、细胞疗法和器官移植等研究领域的有力工具。通过将人免疫和/或癌细胞系一起植入 SCID 小鼠进行研究,科学家已获得了许多重要的成果。然而,小鼠模型的诸多局限,包括与人类在尺寸和代谢上的差异、模拟人类肿瘤异质性的困难等,限制了这些成果在人类疾病研究上更精确的转化。猪与人类的免疫相关基因具有很高的同源性,研究者们采用基因编辑技术对 IL2RG、RAG1/2 等基因进行修饰,已生产出多例 SCID 猪模型,以用来弥合人类和小鼠之间的差异<sup>[55]</sup>。

在人和小鼠中,白细胞介素-2 受体  $\gamma$  (Interleukin-2 Receptor Gamma chain, IL2R $\gamma$ ) 亚基是 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 信号传导所必需的。由于正常淋巴发育需要 IL-2 等细胞因子的参与,因此 IL2R $\gamma$  亚基的缺失会破坏 T 细胞和 NK 细胞发育,对 B 细胞也有一定程度影响。IL2RG 基因位于哺乳动物的 X 染色体上,受体在淋巴细胞上表达。IL2RG 基因的缺失或突变将导致与 X 染色体相关的严重联合免疫缺陷。采用同源重组或者基因编辑技术获得的 IL2RG 基因缺失的转基因猪均表现出胸腺缺失,T 细胞和 NK 细胞数量明显下降<sup>[56-57]</sup>。

重组激活基因 RAG1 和 RAG2 是常染色体中的两个相邻基因,编码的酶参与 T 和 B 细胞受体(分别为 TCR 和 BCR)生成所需的 VDJ 重组,促进 B 和 T 细胞成熟发育。如果两个基因中的任一个被破坏,V(D)J 重组无法启动,T 和 B 细胞发育停滞在不成熟状态。Huang 等<sup>[58]</sup>利用 TALEN 技术获得 RAG1 或 RAG2 敲除的转基因猪,RAG1 或 RAG2 敲除的猪表现出成熟的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞缺失,以及失去 V(D)J 重排的功能。建立了无成熟 B 和 T 淋巴细胞的 SCID 猪模型。随后, Lee 等<sup>[59]</sup>同样利用 TALEN 技术获得 RAG2 单等位基因和双等位基因突变的转基因猪。在 4 只双等位基因突变的猪中,3 只缺失胸腺,1 只胸腺发育不正常。将人诱导性多功能干细胞注射到这些 SCID 猪中,能够快速形成代表多种人体组织的畸胎瘤。2016 年, Lei 等<sup>[2]</sup>应用 CRISPR/Cas9 技术在猪胚胎中同时敲除 RAG2/IL2RG 基因,获得 RAG2/IL2RG 双敲的基因修饰猪,表现出严重的免疫缺陷。与野生型猪相比,该模型在病毒感染实验中显示出感染增加且感染时间更长,同时由于缺乏淋巴细胞,血液中及肠组织中病毒滴度更高。

在另一项研究中, Chen<sup>[60]</sup>的课题组通过应用 CRISPR/ Cas9 技术靶向敲除 IgM 重链基因,生产出 B 细胞缺陷型猪。IgM 是重链和轻链重排后第一个表达的 isotype,对 B 细胞的发育和分化中至关重要。B 细胞缺陷型猪表现出血液中 B 细胞和抗体的缺失,因此可用于模拟人 B 细胞缺陷,同时为进一步实现在猪中大规模生产病原体特异性和高滴度人类多克隆抗体奠定了基础。

近期, Zhang 等<sup>[61]</sup>报道采用 CRISPR/Cas9 技术获得缺失补体蛋白 C3 的猪。补体系统是先天免疫的重要机制,在细菌溶解、炎症反应以及体液和细胞免疫反应等方面发挥重要功能。作为补体系统的中心组分, C3 蛋白已被证明在免疫激活和多种生物功能中具有关键作用。C3 敲除猪为在大动物中进一步阐明该基因的功能以及研究 C3 相关疾病提供了宝贵资源。

### 3.6 其他疾病模型

除了上述几种类别的疾病模型,科学家采用基因编辑技术还对血友病、哈金森-吉尔福德早衰综合征(HGPS)等其他疾病模型进行了尝试。 Hai 等<sup>[62]</sup>通过向受精卵中注射靶向干扰猪 *vWF* 基因的 sgRNA 和 Cas9 mRNA,成功获得 6 只 *vWF* 双等位基因突变仔猪和 5 只单等位基因突变仔猪。对 *vWF* 抗原水平、凝血因子 FVIII 活性以及出血时长等与血友病相关指标的检测结果表明 *vWF* 双等位基因突变体猪表现出人类血友病相类似的表型。HGPS 哈金森-吉尔福德早衰综合征(HGPS)是一种极为罕见的遗传性疾病,疾病特征主要表现为由于心血管并发症而引起青春期早衰及死亡,至今无有效的治疗方法。大多数 HGPS 患者携带杂合的 LMNA c. 1824C > T 突变,进而表达一种称为 progerin 的显性失活突变蛋白。由于在 HGPS 小鼠模型中的有效疗法在 HGPS 临床试验中收效甚微, Dorado 等<sup>[63]</sup>通过 CRISPR-Cas9 基因编辑生产了 HGPS 的第一个大型动物模型,一种敲入杂合 LMNA c. 1824C > T 突变的 Yucatan 小型猪。与 HGPS 患者一样, HGPS 小型猪内源性共表达 Progerin 和正常的核纤层蛋白 A/C,并表现出严重的生长迟缓、脂肪代谢障碍、皮肤和骨骼改变、心血管疾病以及早期死亡。作者同时还发现了由于微血管损伤和心肌间质纤维化导致的心肌灌注减少。这些之前未发现的表象很可能可作为对患者疾病进展监测的指标。HGPS 小型猪为研究者提供了一个合适的模型,能够在临床前阶段用于测试治疗设备并优化候选疗法,从而加速对 HGPS 患者有效应用的开发。

## 4 结论

随着基因组编辑工具的广泛应用,具有特异遗传修饰的大型动物模型出现速度得到了大幅提升。一方面表现在转基因效率上,由于可以同时多个位点对个体进行编辑,以往需要至少几年时间才能获得的大型动物模型现在仅需要几个月;另一方面,生产转基因动物的途径也不仅局限于体细胞核移植,通过受精卵注射相应人工核酸酶的方法同样高效。相信在科学家们的不懈努力下,对现有基因编辑工具的优化以及新技术的出现将进一步拓宽其应用,从而促进建立农业和生物医学中所需基因型的优良动物模型。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] WELLS K D, PRATHER R S. Genome-editing technologies to improve research, reproduction, and production in pigs [ J ]. Mol Reprod Dev, 2017, 84(9):1012-1017.
- [ 2 ] 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.

- [ 3 ] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157:1262-1278.
- [ 4 ] BIBIKOVA M, BEUMER K, TRAUTMAN J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases[J]. *Science*, 2003, 300(5620):764.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] JOUNG J K, SANDER J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 1:49-55.
- [ 7 ] JINEK M, CHYLINSKI K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096):816-821.
- [ 8 ] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121):823-826.
- [ 9 ] YANG Y G, SYKES M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future[J]. *Nat. Rev. Immunol.* ,2007, 7:519-531.
- [ 10 ] DAI Y, VAUGHT T D, BOONE J, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs[J]. *Nat. Biotechnol.* , 2002, 20:251-255.
- [ 11 ] LAI L X, KOLBER-SIMONDS D, PARK K W, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. *Science*, 2002, 295(5557):1089-1092.
- [ 12 ] PHELPS C J, KOIKE C, VAUGHT T D, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs[J]. *Science*, 2003, 299(5605):411-414.
- [ 13 ] KOLBER-SIMONDS D, LAI L, WATT S R, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2014, 101:7335-7340.
- [ 14 ] KUWAKI K, TSENG Y L, DOR F J, et al. Heart transplantation in baboons using  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience[J]. *Nat. Med.* ,2005, 11:29-31.
- [ 15 ] BYRNE G W, MCGREGOR C G A, BREIMER M E. Recent investigations into pig antigen and anti-pig antibody expression[J]. *Int. J. Surg.* , 2015, 23:223-228.
- [ 16 ] BYRNE G, AHMAD-VILLIERS S, DU Z, et al. B4GALNT2 and xenotransplantation: a newly appreciated xenogeneic antigen [J]. *Xenotransplantation*, 2018, 25(5):e12394.
- [ 17 ] GAO H, ZHAO C, XIANG X, et al. Production of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-deficient pigs by CRISPR/Cas9 and handmade cloning[J]. *J. Reprod. Dev.* ,2017, 63:17-26.
- [ 18 ] MIYAGAWA S, MATSUNARI H, WATANABE M, et al. Generation of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs[J]. *J. Reprod. Dev.* ,2015, 61:449-457.
- [ 19 ] YANG H, WU Z. Genome Editing of Pigs for Agriculture and Biomedicine[J]. *Front. Genet*, 2018, 9:360.
- [ 20 ] HRYHOROWICZ M, ZEYLAND J, SŁOMSKI R, et al. Genetically modified pigs as organ donors for xenotransplantation[J]. *Mol. Biotechnol.* , 2017, 59:435-444.
- [ 21 ] NOTTLE M B, SALVARIS E J, FISICARO N, et al. Targeted insertion of an anti-CD2 monoclonal antibody transgene into the GGTA1 locus in pigs using FokI/Cas9[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:8383.
- [ 22 ] REYES L M, ESTRADA J L, WANG Z Y, et al. Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease[J]. *J Immunol*, 2014;193:5751-5757.
- [ 23 ] YANG L H, GÜELL M, NIU D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses( PERVs) [J]. *Science*, 2015, 350(6264):1101-1104.
- [ 24 ] NIU D, WEI H J, LIN L G, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357):1303-1307.
- [ 25 ] WU J, PLATERO L A, GIL M A, et al. Generation of human organs in pigs via interspecies blastocyst complementation[J]. *Reprod. Domest. Anim.* ,2016, 51:18-24.
- [ 26 ] MATSUNARI H, NAGASHIMA H, WATANABE M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2013, 110:4557-4562.
- [ 27 ] WU J, PLATERO L A, SAKURAI M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2017, 168:473-486.
- [ 28 ] WU J, VILARINO M, SUZUKI K, et al. CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs[J]. *Sci. Rep.* ,2017, 7:10487.
- [ 29 ] WANG J, LIU M, ZHAO L, et al. Disabling of nephrogenesis in porcine embryos via CRISPR/Cas9-mediated SIX1 and SIX4 gene targeting[J]. *Xenotransplantation*, 2019, 26(3):e12484.
- [ 30 ] YANG Y, WANG K, WU H, et al. Genetically humanized pigs exclusively expressing human insulin are generated through custom endonuclease-mediated seamless engineering[J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(2):174-177.
- [ 31 ] CARLSON D F, TAN W, LILLICO S G, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,2012, 109:17382-17387.
- [ 32 ] HUANG L, HUA Z, XIAO H, et al. CRISPR/Cas9-mediated ApoE<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> double gene knockout in pigs elevates serum LDL-C and TC levels[J]. *Oncotarget*, 2017, 8:37751-37760.
- [ 33 ] 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, 21:979-982.
- [ 34 ] WANG Y, DU Y, SHEN B, et al. Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA[J]. *Sci Rep*, 2015,

- 5;8256.
- [35] LESAGE S, BRICE A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors[J]. *Hum. Mol. Genet.*, 2009, 18;48-59.
- [36] YAO J, HUANG J, HAI T, et al. Efficient bi-allelic gene knockout and site-specific knock-in mediated by TALENs in pigs[J]. *Sci Rep*, 2014, 4;6926.
- [37] ZHOU X, XIN J, FAN N, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer[J]. *Cell Mol. Life Sci.*, 2015, 72;1175-1184.
- [38] WANG X, CAO C, HUANG J, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep.*, 2016, 9(6);20620.
- [39] ZHU X X, ZHONG Y Z, GE Y W, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Generation of Guangxi Bama Minipigs Harboring Three Mutations in  $\alpha$ -Synuclein Causing Parkinson's Disease[J]. *Sci Rep.*, 2018, 8(1);12420.
- [40] 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.
- [41] CHO B, KIM S J, LEE E J, et al. Generation of insulin-deficient piglets by disrupting INS gene using CRISPR/Cas9 system[J]. *Transgenic Res.*, 2018, 27(3);289-300.
- [42] SHEETS T P, PARK C H, PARK K E, et al. Somatic Cell Nuclear Transfer Followed by CRISPR/Cas9 Microinjection Results in Highly Efficient Genome Editing in Cloned Pigs[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12);2031.
- [43] BURLISON J S, LONG Q, FUJITANI Y, et al. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells[J]. *Dev Biol*, 2008, 316;74-86.
- [44] JENNINGS R E. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment[J]. *Diabetes*, 2013, 62;3514-3522.
- [45] SHEETS T P, PARK K E, PARK C H, et al. Targeted Mutation of NGN3 Gene Disrupts Pancreatic Endocrine Cell Development in Pigs[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1);3582.
- [46] TANIHARA F, HIRATA M, NGUYEN N T, et al. Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation[J]. *Anim Sci J*, 2019, 90(1);55-61.
- [47] YU H, LONG W, ZHANG X, et al. Generation of GHR-modified pigs as Laron syndrome models via a dual-sgRNAs/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1);41.
- [48] HINRICHS A, KESSLER B, KUROME M, et al. Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver[J]. *Mol Metab*, 2018, 11;113-128.
- [49] WANG K, JIN Q, RUAN D, et al. Cre-dependent Cas9-expressing pigs enable efficient in vivo genome editing[J]. *Genome Res*, 2017, 27;2061-2071.
- [50] SHEN Y, XU K, YUAN Z, et al. Efficient generation of P53 biallelic knockout Diannan miniature pigs via TALENs and somatic cell nuclear transfer[J]. *J. Transl. Med.*, 2017, 15;224.
- [51] TANIHARA F, HIRATA M, NGUYEN N T, et al. Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10);e0206360.
- [52] TAN W, CARLSON D F, LANCTO C A, et al. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, 110(41);16526-16531.
- [53] WANG X, ZHOU J, CAO C, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs[J]. *Sci Rep.*, 2015, 21(5);13348.
- [54] KANG, J T, RYU J, CHO B, et al. Generation of RUNX3 knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting[J]. *Reprod. Domest. Anim.*, 2016, 51;970-978.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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;74.
- [58] HUANG J, GUO X, FAN N, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency[J]. *J. Immunol.*, 2014, 193;1496-1503.
- [59] LEE K, KWON D N, 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;7260-7265.
- [60] 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;437-444.
- [61] ZHANG W, WANG G, WANG Y, et al. Generation of complement protein C3 deficient pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1);5009.
- [62] HAI T, TENG F, GUO R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system[J]. *Cell Res*, 2014, 24;372-375.
- [63] DORADO B, PLØEN G G, BARETTINO A, et al. Generation and characterization of a novel knockin minipig model of Hutchinson-Gilford progeria Syndrome[J]. *Cell Discov*, 2019, 19(5);16.