DOI:10.16016/j.2097-0927.202303025

应用 CRISPR/Cas9 技术构建 Tet-on 调控表达 uPA 的人源化肝细胞嵌合小鼠

白家驷,毛 青 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院传染病研究所,重庆市传染病研究重点实验室

[摘要] **目的** 构建 Tet-on 调控小鼠肝脏特异性表达 uPA 基因的 NOD-SCID 背景的转基因小鼠,并通过人肝癌细胞移植修复小鼠亚急性肝损伤进而构建人源化肝细胞嵌合小鼠。**方法** 采用 CRISPR/Cas9 技术,在 gRNA 引导下,Cas9 核酸内切酶于 Rosa26 基因位点切割并编辑,插入目的基因 pTight-uPA-pA-Alb promoter-rtTA-pA 表达框。使目的基因能跟随染色体稳定遗传,生物学功能保持稳定。新培育的转基因小鼠分为 4 组:诱导组($n=17$)、移植组($n=16$)、未诱导组($n=5$)和空白对照组($n=5$)。诱导组经强力霉素诱导 3 周,肝脏中表达的 uPA 能造成小鼠肝脏亚急性损伤;再通过人肝癌细胞移植修复。移植 4 周后,通过小鼠血清生化学、组织病理学,评估该人源化肝细胞嵌合小鼠的效果。**结果** 诱导组小鼠血清中 uPA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)均高于未诱导组和空白对照组($P<0.01$);移植组人白蛋白含量显著高于未移植组($P<0.01$)。组织病理学 HE 染色发现人肝癌细胞参与小鼠肝组织的修复,激光共聚焦显微镜观察显示鼠肝脏中有人肝癌细胞聚集并表达人白蛋白,组化染色人角质蛋白(CK18)表达成阳性。**结论** 新构建的转基因小鼠能通过强力霉素诱导小鼠肝脏中 uPA 表达,造成肝脏亚急性损伤,并通过人源肝癌细胞移植修复进而构建人源化肝细胞嵌合小鼠。

[关键词] CRISPR/Cas9 技术;Rosa26 基因位点;人源化;嵌合肝;转基因小鼠;尿激酶纤溶酶原激活物

[中图法分类号] R-332; R322.47; R394-3 [文献标志码] A

Construction of humanized chimeric mice with Tet-on regulating liver specific expression of uPA using CRISPR/Cas9 technology

BAI Jiasi, MAO Qing Institute of Infectious Diseases, Chongqing Key Laboratory of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct NOD-SCID transgenic mice with Tet-on regulated liver specific expression of urokinase plasmin activator (uPA), repair subacute liver injury in mice through human liver cancer cell transplantation, and thereby establish humanized liver cell chimeric mice. **Methods** With CRISPR/Cas9 technology, under the guidance of gRNA, Cas9 endonuclease was cut and edited at Rosa26 locus, and then inserted into the target gene pTight-uPA-pA-Alb promoter rtTA-pA expression frame in order to enable the target gene to follow the stable inheritance of chromosomes and maintain stable biological functions. The newly cultivated transgenic mice were divided into induction group ($n=17$), transplantation group ($n=16$), non-induction group ($n=5$), and blank control group ($n=5$). The induction group was induced by doxycycline for 3 weeks, and then uPA expression in the liver caused subacute liver injury in mice, which was repaired through transplantation of human liver cancer cells. After 4 weeks of transplantation, the effect of humanized liver cell chimeric mice was evaluated through mouse serum biochemistry and histopathology. **Results** The serum levels of uPA and alanine aminotransferase (ALT) were significantly higher in the induction group than those the non-induction group and blank control group ($P<0.01$), so was the human albumin content in the transplantation group than that of the 2 groups without

[通信作者] 毛 青,E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

transplantation ($P<0.01$). HE staining showed that human hepatoma cells participated in the repair of mouse liver tissues. Laser confocal microscopy displayed that human hepatoma cells gathered in the mouse liver and expressed human albumin. Histochemical staining showed that human keratin (CK18) was positive in the mouse liver tissues. **Conclusion** The newly constructed transgenic mice can induce uPA expression in the mouse liver through doxycycline, causing subacute liver damage, and then construct humanized chimeric mice through transplantation and repair of human liver cancer cells.

[**Key words**] CRISPR/Cas9 technology; Rosa26 locus; humanized, chimeric liver; transgenic mice; urokinase plasmin activator

Corresponding author: MAO Qing, E-mail: qingmao@tmmu.edu.cn

目前,人源化肝细胞嵌合小鼠模型是嗜肝病毒研究较好的实验平台,能够用于观察嗜肝病毒感染嵌入的人源肝细胞的致病过程及体内免疫应答反应,有助于致病机制和治疗药物研究。早期的研究表明移植的人肝细胞在受体肝脏中几乎不能增殖。为解决这个问题,尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasmin activator,uPA)被用于小鼠模型的开发[1]。uPA 具有肝毒性,通过对细胞内底物纤溶酶原的激活导致严重的肝损伤,并降解肝脏结构重组的细胞外基质蛋白[2];另外 uPA 能激活肝细胞生长因子,具有肝有丝分裂原的特性,能有效地促进移植肝细胞的增殖[3-4]。

然而,携带 uPA 基因的小鼠出生后常伴随出血和肝损伤,导致这种小鼠成活率低,繁殖能力差。部分小鼠肝细胞通过删除重组基因得以快速增殖,在出生后 8~12 周恢复整个肝脏。移植肝细胞要在受体肝脏中良好增殖,受体肝脏需处于损伤状态,同时还要避免受体肝细胞快速增殖而竞争性抑制移植肝细胞的生长。为此,课题组构建了含四环素反式原件 Tet-on 的慢病毒质粒 CN362,有效地控制 uPA 基因在小鼠肝细胞中表达的时间和剂量[5],使人源肝细胞移植成为可控。

构建 Tet-on 调控小鼠模型,传统上可以采用含重组目的基因的腺病毒载体感染并结合小鼠尾静脉注入分别携带了 Tet-on 的 2 个正反式元件组分,然后进行大批量的繁殖、杂交和筛选,获得有效调控 uPA 表达的基因型和表型[6]。另一种方法是将构建好的慢病毒质粒直接采用原核注射的方式随机注入小鼠体内,进行广泛的培育筛选[4]。这些方法成功率极低[7-8],而且所获得的基因型与表型是否能够稳定的遗传表达存在不确定性。

本研究采用 CRISPR/Cas9 技术[9-10],定点插入 Tet-on 调控的目的基因片段,不仅有效解决了 uPA 新生小鼠肝脏损伤出血死亡的难题[11-12],而且目的基因及所具备的生物学功能可稳定地遗传到子代。通过强力霉素诱导实验及人源肝细胞移植修复,成功构建 Tet-on 调控表达 uPA 的人源化肝细胞嵌合小鼠。

1 材料与方法

1.1 转基因小鼠构建策略

采用 CRISPR/Cas9 技术,通过同源重组的方式,在 Rosa26 基因位点定点插入 pTight-uPA-pA-Alb promoter-rtTA-pA 表达框(图 1)。该载体包含 3.9 kb 5′同源臂、pTight-uPA-pA-Alb promoter-rtTA-pA 和 3.4 kb 3′同源臂。

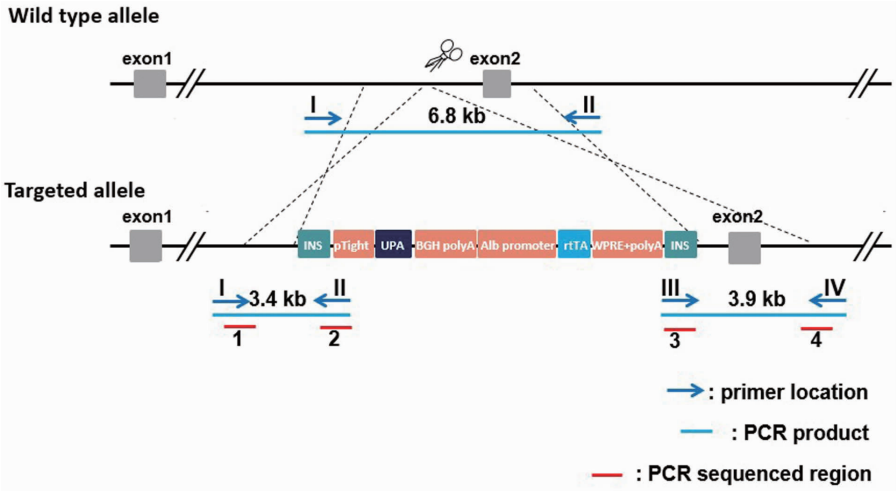


图 1 Rosa26 基因位点插入目的基因表达框结构及 F1 代小鼠鉴定策略

1.2 试剂与仪器

限制性内切酶 *Not* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、克隆重组试剂 In-Fusion; HD Cloning Kit 及 PCR 相关试剂(TaKaRa 大连宝生物工程有限公司);通用 Rosa 位点载体 Rsoa26-Ins-Ins(上海南方模式科技公司);CN362 质粒于本研究所构建并保存[5];mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit、MEGAclearTM 试剂盒、MEGAshortscript 试剂盒(ThermoFisher 上海金畔生物科技有限公司);常规化学试剂主要购自 Sigma;胶回收 Kit QIAquick 试剂盒(上海玉博生物科技有限公司);引物合成于生工生物工程(上海)股份有限公司;小鼠尿激酶型纤溶酶活物 uPA(MM-0101M1)、小鼠丙氨酸氨基转移酶 ALT(MM-0260M1)、人白蛋白 ALB(MM-13348H1)购于江苏酶免实业有限公司;免疫荧光兔抗人单克隆抗体 ALB (proteintech 武汉三鹰生物技术有限公司);二抗为山羊抗兔:Rhodamine λ=560 nm(SA00007-2);人角质蛋白 18(CK-18)单克隆抗体小鼠抗人(elabscence 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,catalog NO:E-AB-71046),人肝癌细胞 HepG2-NTCP(BFN60805958,中国细胞库,上海),盐酸强力霉素(Macklin 上海麦克林生化公司)。

梯度 PCR 仪(eppendorf 公司),凝胶成像仪和核酸电泳仪(Tanon 公司),水浴锅,细菌培养箱和摇床(上海精宏公司),蔡司 LSM880 倒置激光共聚焦显微镜。

1.3 动物培育及饲养

动物构建实验在上海南方模式生物科技股份有限公司动物中心进行,后期动物移植验证实验在陆军军医大学实验动物中心进行。NOD-SCID 小鼠 4 周龄,体质量 12~15 g,雌雄 3∶1,共 120 只,包括后期扩大种群部分,C57BL/6J 小鼠 8 周龄,体质量 20~25 g,雌性 20 只。动物实验均按照上海模式生物中心动物护理和使用委员会的指导方针进行。所有小鼠发育健康。小鼠饲养在无菌设施中,单独通风,可以任意进食和水。室内 12 h 光/暗循环照明。

1.4 Cas9 和 gRNA 体外转录结构的构建

体外合成 Cas9 mRNA,用 *Xba* Ⅰ线性化载体,并根据制造商的说明,用 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 体外转录,然后使用 MEGAclear™ 试剂盒进行纯化。选择 5′-GGACACACACACATAGGAGGCT-3′作为 Cas9 靶向引导 RNA(gRNA),并使用 MEGAshortscript 试剂盒进行体外转录,然后使用 MEGAclear™ 试剂盒进行纯化。将 Cas9 mRNA 和 gRNA 用无 RNase TE 缓冲液(1 mmol Tris Cl pH 8.0,0.1 mmol EDTA)稀释,在-80 ℃储存备用。微注射前解冻并放置在冰上操作。

1.5 同源重组载体构建

通过 *Not* Ⅰ酶切 CN362 质粒产生粘性末端,PCR 扩增得到目的片段 polyA1,再使用 In-Fusion® HD Cloning Kit 中 DNA 连接酶将目的片段与酶切后的载体进行重组。同样通过 *Kpn* Ⅰ酶切新构建载体 CN362-polyA1 质粒,产生粘性末端,PCR 扩增得到目的片段 polyA2,再通过 In-Fusion® HD Cloning Kit 中 DNA 连接酶将目的片段和酶切后的载体进行重组,引物见表 1。构建出 Rsoa26-polyA1(Ins)-CN362-polyA2(Ins)打靶质粒。

表 1 同源打靶质粒构建引物序列

引物名称	序列(5′→3′)
CN362-*Not* Ⅰ-PA-F	tccaccggtgcggccCTAGAGCTCGCTGATCAGCC
CN362-*Not* Ⅰ-PA-R	gaagctagagcggccTCCCCAGCATGCCTGCTATT
CN362-*Kpn* Ⅰ-PA-F	ccagtcacacctcagCTAGAGCTCGCTGATCAGCC
CN362-*Kpn* Ⅰ-PA-R	tcattggtcttaaagCTCGAGTCCCCAGCATGCCTGCTATT
Rosa26-CN362-P-F	ggggctgtccctcgaattacagggacagcagagatccagtttggttagta
Rosa26-CN362-P-R	gaggatggggctcgagtggctaagatctacagctgccttgtaagt

1.6 小鼠原核微注射及 F0 代产生

按照标准程序,受精卵由 NOD-SCID 雌雄合笼后,NOD-SCID 雌性超排卵获得。将构建的同源重组质粒(20 ng/mL)、sgRNA(2 ng/μL)和 Cas9 mRNA(5 ng/mL)的混合液微量注射到 NOD-SCID 受精卵中。再将注射的受精卵转移到伪怀孕的 ICR(C57BL/6J)雌性小鼠的输卵管中,分娩获得幼崽。

采用同源重组后,目的基因两端的固定片段:包含 3′端同源臂中 3.4 kb 和 5′端同源臂中 3.9 kb 进行筛选(图 1)。

同源臂基因分型鉴定的引物(P1~P4):P1-F:5′-GCCGGGCCTCGTCGTCT-3′, P2-R:5′-TTTTTGGGGGT-GATGGTGGTC-3′,筛选 5′同源臂重组;P3-F:5′-ACCC-AGGCCGTTCTATGATTC-3′,P4-R:5′-AGTTCTTCCTGC-CTGCCTTCT-3′,筛选 3′同源臂重组。

经长片段 PCR 鉴定和筛选,共获得 2 只正确同源重组的 F0 代转基因小鼠;F0 代小鼠与 NOD-SCID 小鼠交配获得 3 只阳性 F1 代小鼠。将携带同源臂基因分型的 F1 代转基因小鼠继续与野生型 NOD-SCID 小鼠繁殖培育,扩大种群。鉴定方法与 F0 代小鼠筛选方法相同。

1.7 诱导小鼠肝损伤与人源肝癌细胞移植

该转基因小鼠繁殖培育 5 代后获得 17 只,鼠龄在 4~38 周。诱导组(n=17),口服强力霉素溶液,浓度 50 μg/mL,每天约 5 mL,腹腔注射强力霉素溶液,浓度

100 μg/mL,每 2 天 1 次,持续 3 周;后续培育的小鼠作为未诱导组(n=5)和空白对照组(n=5),正常饮用纯净水和鼠粮。颌下静脉穿刺采血,检测血清 uPA 和 ALT。移植组(n=16)来源于诱导组小鼠。小鼠腹腔左侧开一小口,行脾脏穿刺注射。注入 HepG2-NTCG 细胞 100 μL/只(2.5×10^7 个/mL),之后缝合。移植 4 周后,行摘除小鼠眼球采血术,检测人白蛋白(ALB);同时摘取小鼠肝脏组织,做组织病理学切片染色。

1.8　小鼠血清学及免疫组织化学检测

采用 ELISA 检测小鼠血清中 uPA、ALT 及人 ALB 水平;组织切片进行 HE 染色、抗人白蛋白免疫荧光染色及抗人角质蛋白免疫组化染色;激光共聚焦显微镜下观察人肝癌细胞及人白蛋白的表达。

1.9　统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.4 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间采用非配对 t 检验,多组间采用单因素方差分析。$P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

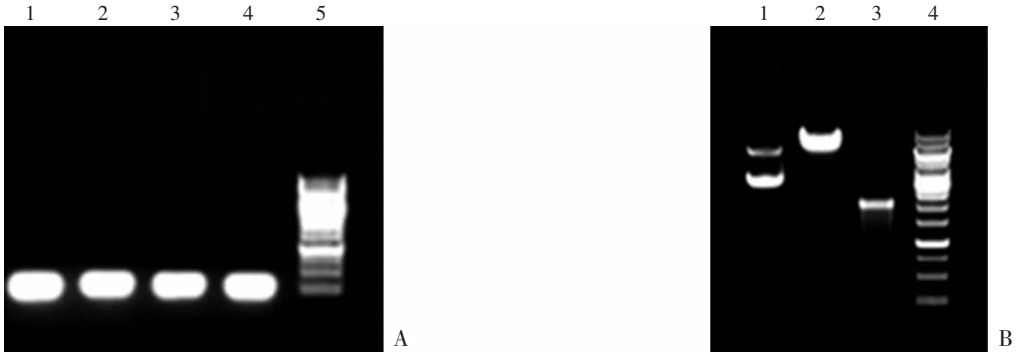
2　结果

2.1　Cas9 和 gRNA 体外转录结构的构建

体外合成 Cas9 靶向引导 RNA(gRNA)5′-GGACACACACACATAGGAGGCT-3′理论设计为 22 bp,与电泳结果相一致(图 2A);用 *Xba* Ⅰ酶切 t7-Cas9 质粒使载体线性化,纯化后,进行体外转录获得 Cas9 mRNA,纯化后电泳与设计吻合(图 2B)。

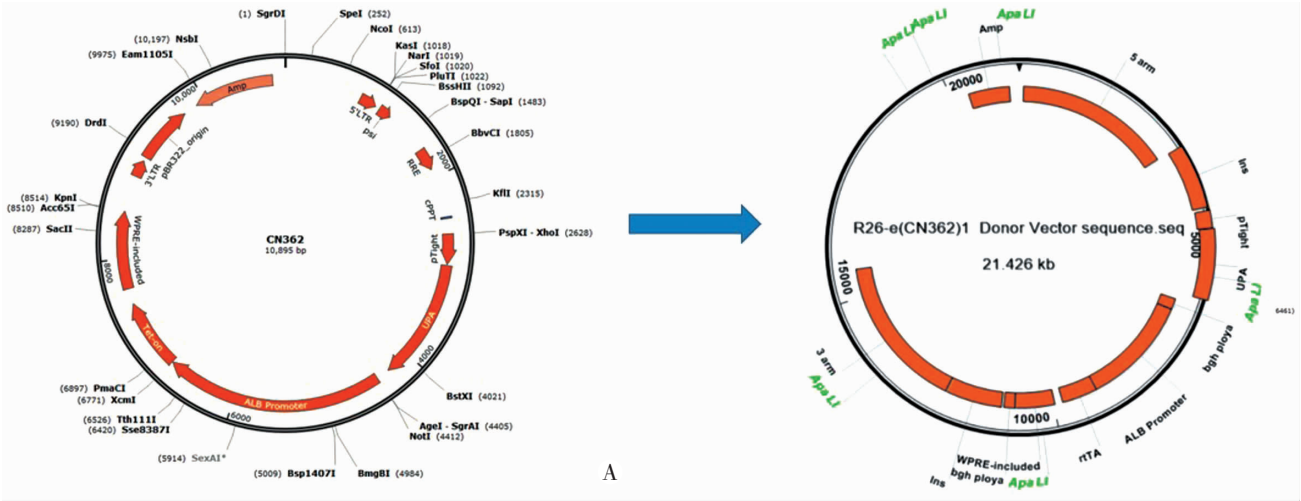
2.2　同源重组打靶质粒构建结果

通过 2 次相似的酶切质粒和 PCR 扩增目的基因,DNA 重组试剂盒将所得目的片段和酶切后的载体进行重组,获得过度载体 CN362-polyA1,最终构建出 Rsoa26-polyA1(Ins)-CN362- polyA2(Ins)打靶质粒(图 3)。



A:guide RNA　1~4:guide RNA1;5:1 kb DNA Marker (Thermo SMO311);B:t7-Cas9 质粒酶切、转录产物　1:t7-Cas9 质粒;2:线性化 t7-Cas9 质粒;3:Cas9 mRNA;4:1 kb DNA Marker (Thermo)

图 2　gRNA 和 Cas9 质粒体外 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

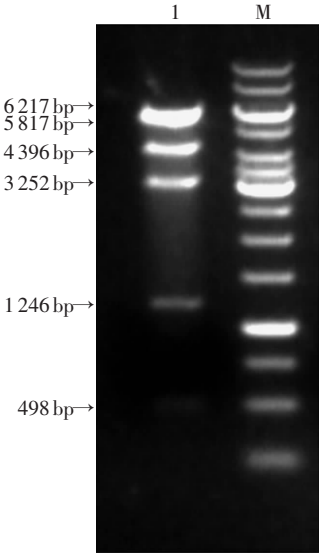


A:CN362 质粒示意图;B:Rsoa26-polyA1-CN362-polyA2B 打靶质粒图

图 3　CN362 质粒及 Rsoa26-polyA1-CN362-polyA2 打靶质粒

2.3 打靶质粒酶切鉴定

为了评估所构建的打靶质粒的准确性,采用 ApaL Ⅰ内切酶,酶切 Rsoa26-polyA1-CN362-polyA2 打靶质粒进行鉴定,理论条带大小分别为 6 217、5 817、4 396、3 252、1 246 bp 和 498 bp。结果与理论条带大小相吻合(图 4)。



1:ApaL Ⅰ酶切鉴定结果;M:1 kb DNA Ladder

图 4 打靶载体酶切鉴定电泳结果

2.4 转基因小鼠 F1 代的鉴定及筛选

为了获得 F1 代转基因小鼠,采用长片段 PCR 技术,分别对 F1 代小鼠双侧同源臂进行鉴定,结果显示:左侧含有 3.4 kb 片段的 5、9、12 号小鼠为阳性(图 5A),右侧含有 3.9 kb 片段的 5、9、12 号小鼠为阳性(图 5B),从而从 F1 代小鼠中筛选出 5、9、12 号为阳性小鼠。

2.5 诱导组目的基因表达和人源肝细胞移植修复的效果明显

诱导组采用口服加腹腔注射的方式进行诱导,诱导 3 周后,血清中 uPA、ALT 水平明显高于未诱导组和空白对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);诱导组小鼠经移植人源肝细胞修复小鼠肝脏的效果明显,移植组小鼠行脾脏穿刺注入人源肝细胞后 4 周,血清中人 ALB 的水平明显高于未移植组,差异有统计学意义($P<0.01$,表 2)。

表 2 各组小鼠血清中 uPA、ALT、ALB 的含量($\bar{x}\pm s$)

组别	n	uPA (ng/mL)	ALT(IU/L)	ALB(ng/mL)
空白对照组	5	-	18.60±5.35 [a]	-
未诱导组	5	-	21.34±5.18 [a]	-
诱导组	17	118.57±16.49	326.94±23.80	-
移植组	16	-	-	133.56±49.74

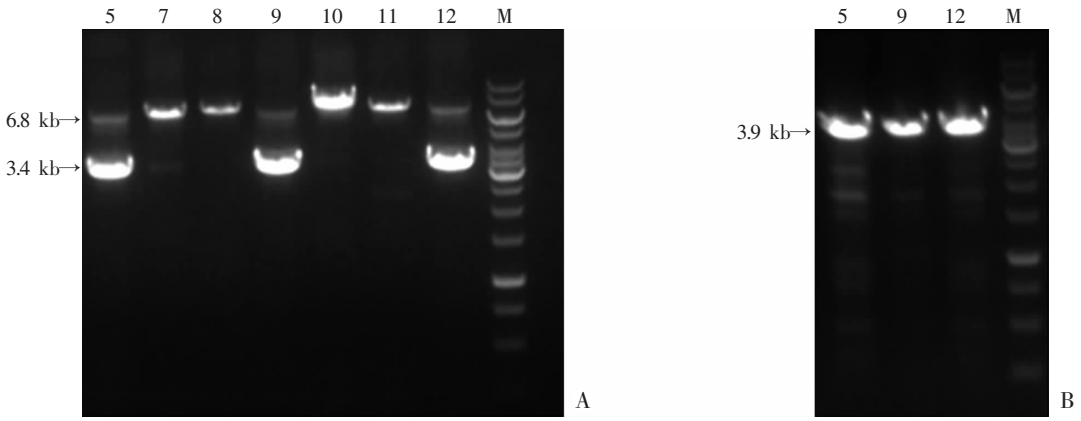
a: $P<0.01$,与诱导组比较

2.6 移植后 4 周肝脏病理切片 HE 染色结果

转基因小鼠肝组织病理学切片 HE 染色,并用不同的放大倍数进行比较,结果显示:移植人肝癌细胞局部聚集成嵌合生长(图 6A),局部参与损伤小鼠肝小叶组织结构修复(图 6B),图中肝癌细胞呈紫红色,排列紧密成条索状,形成新生肝组织(图 6C)。

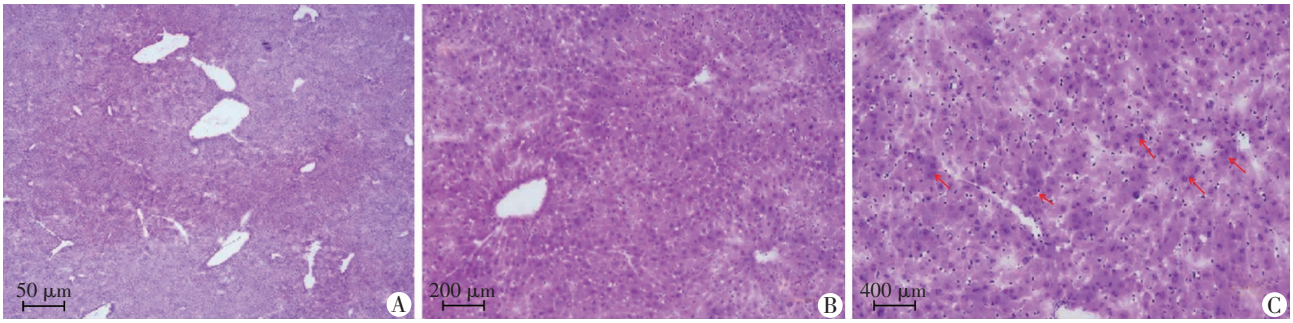
2.7 移植后 4 周肝脏病理切片免疫荧光染色结果

移植组小鼠肝组织切片抗人白蛋白免疫荧光染色显示人肝癌细胞成片分布,并且细胞有大量的红色荧光,即抗人白蛋白阳性表达,蓝色为 DAPI 染色。说明人肝癌细胞移植到小鼠肝脏中,并参与修复部分损伤小鼠肝组织,形成人肝癌细胞的嵌合生长(图 7)。



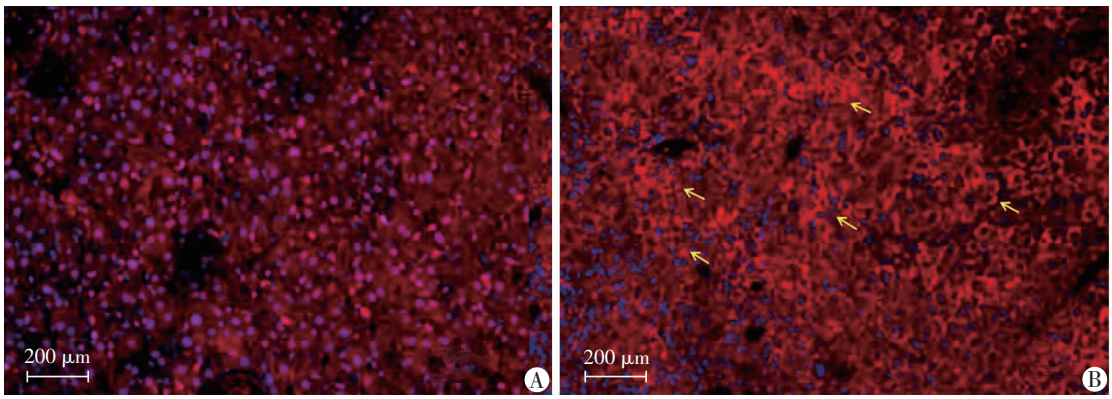
A:5、9、12 号小鼠左侧含有 3.4 kb 片段电泳结果;B:5、9、12 号小鼠右侧含有 3.9 kb 片段的电泳结果;M:1 kb DNA ladder

图 5 F1 代小鼠同源臂鉴定 PCR 产物电泳结果



A:人肝癌细胞局部聚集成嵌合生长;B:人肝癌细胞参与小鼠肝小叶组织结构的修复;C:人肝癌细胞成条索状紧密排列形成新生肝组织　箭头示人肝癌细胞

图 6　移植组肝脏切片 HE 染色对比观察



A:正常小鼠肝脏组织切片;B:人肝癌细胞移植后的小鼠肝脏　箭头示人肝癌细胞抗人白蛋白阳性表达

图 7　移植组肝脏切片抗人 ALB 免疫荧光染色观察

2.8　移植后 4 周肝脏病理切片免疫组化染色结果

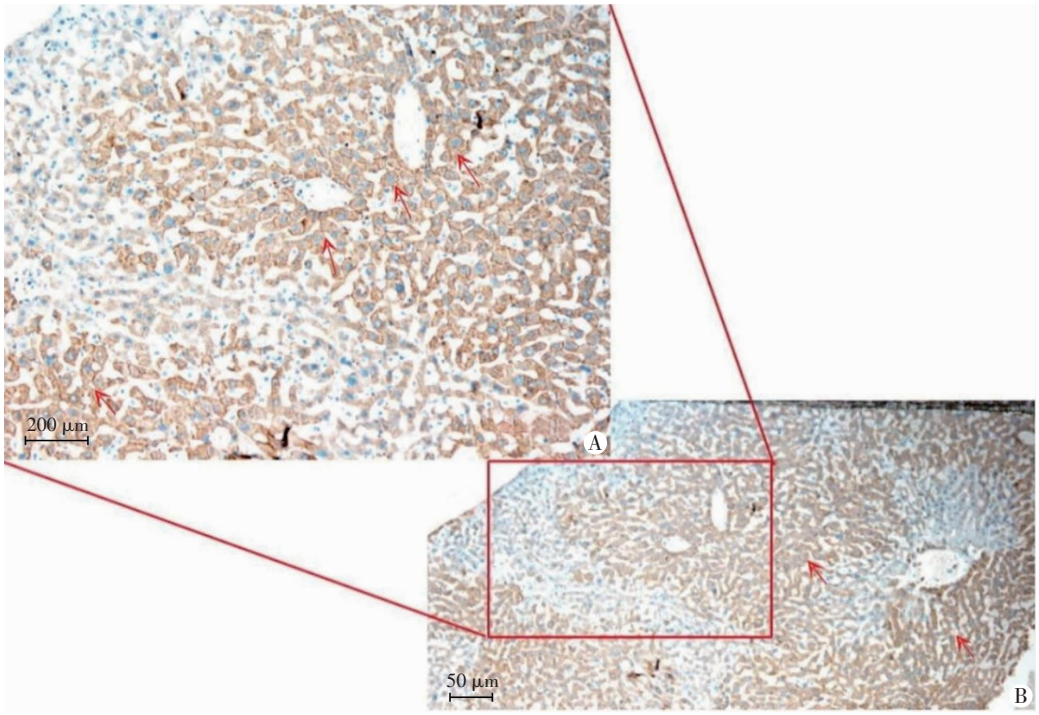
移植组肝组织切片抗人角质蛋白 18(CK18)免疫组化染色,局部阳性成片分布,小鼠肝小叶组织被替换,新生肝组织细胞中有明显的橙黄色颗粒沉着,即抗人 CK18 阳性表达。说明人肝癌细胞移植到小鼠肝脏中,并参与修复部分损伤小鼠肝组织,形成人肝癌细胞的嵌合生长(图 8)。

3　讨论

人源化肝细胞嵌合小鼠是研究嗜肝病毒感染的重要工具[13]。肝细胞特异性表达尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)所产生的肝毒性,为移植人肝细胞的生长和增殖修复创造了一个“适宜的环境”[14-15]。通过肝细胞移植产生的人源化肝细胞嵌合小鼠允许 HBV 和 HCV 感染,并在体内建立完整的病毒感染生命周期[16-17]。而采用缺乏富马酰乙酰乙酸水解酶(fumaroyl acetoacetate hydrolase,FAH)基因的免疫缺陷动物建立的小鼠对 HBV 和 HCV 感染也很敏感[18-19]。但由于受体小鼠免疫缺陷影响,该模型不能用于监测抗病毒免疫反应;而且该模型小鼠需要终身服药,增加了小鼠癌变的风险。可见 uPA 转基因小鼠构建的重要意义。

然而构建 uPA 转基因小鼠面临着很大的困难,一直阻碍着 uPA 转基因嵌合肝小鼠研究工作的进步。如果 uPA 不受控制,该小鼠出生后会因肝脏出血不止而死亡。在前期研究中采用 Tet-on 四环素反式调控原件已经很好地解决了这一难题,并在小鼠肝细胞水平得到了验证[5]。但建模过程仍旧存在制备技术复杂,需要大批量的繁殖、杂交筛选,浪费大量的人力物力,未能取得理想的结果。

本研究采用 CRISPR/Cas9 技术,体外合成 Cas9 mRNA,选择 5′-GGACACACACACATAGGAGGCT-3′作为 Cas9 靶向引导 RNA(gRNA),进行体外转录和纯化。将目的基因表达框通过 gRNA 引导,选择与 gRNA 序列相匹配的 Rosa26 基因位点相结合,进行 DNA 切割[20],造成双链断裂,插入并编辑目的基因表达框。



A:人肝癌细胞参与修复部分小鼠肝小叶组织结构;B:人肝癌细胞在小鼠肝脏中成嵌合生长抗人 CK18 免疫组化染色成阳性;箭头示抗人 CK18 免疫组化染色呈阳性

图 8 移植组肝脏切片抗人 CK18 免疫组化染色观察

通过同源重组的方式构建打靶质粒,pTight-uPA-pA-Alb promoter-rtTA-pA 表达框来源于前期构建的 CN362 质粒,选择多个内切酶在不同的酶切位点酶切,并通过 PCR 扩增得到相关的目的片段 pTight-uPA-pAlb-rtTA-WPRE,再运用 In-Fusion cloning 重组方法链接到 Rosa26 基因位点打靶质粒框架 Rsoa26-Ins-Ins 中,构成完整的同源重组打靶质粒 Rsoa26-polyA1-CN362-polyA2[21]。基因测序结果与设计相吻合。

在原核微注射环节,本研究对注射方案进行了重新编辑,按优化后的比例将 Cas9 mRNA、gRNA 和 donor vector 进行稀释并微注射。并将注射后的合子移入假孕 C57BL/6J 雌性小鼠输卵管中,提高了新种系转基因小鼠培育的成功率,也避免了 NOD 小鼠食子的癖好。至此整个目的基因能够准确稳定地插入到小鼠 6 号染色体 Rosa26 基因位点上,并随着新种系的繁衍而稳定遗传。

经长片段 PCR 鉴定结果证实,共获得 2 只同源重组的 F0 代小鼠;再将 F0 代小鼠与 NOD-SCID 小鼠交配繁殖,共获得 17 只 NOD-SCID 背景转基因小鼠。受制于 NOD-SCID 小鼠繁殖率低下的影响,本研究只获得了杂合子小鼠。

强力霉素诱导 3 周后,颌下静脉穿刺采血,ELISA 检测血清中 uPA 和 ALT 水平。HepG2-NTCP 肝癌细胞移植 4 周后,血清中检测到人 ALB 的表达,证明新建小鼠模型成功;组织切片 HE 染色可见 HepG2-NTCP 肝癌细胞移植 4 周后,肝癌细胞的生长状态良好并参与修复部分小鼠肝小叶受损的肝组织。人 ALB 免疫荧光染色,激光共聚焦显微镜下观察到人 ALB 显著表达,免疫组化染色镜下观察到抗人角质蛋白 18(CK18)在肝小叶周围高表达,进一步证实模型的可靠性。与传统技术相比,采用 CRISPR/Cas9 技术构建转基因动物的优点主要体现在目标蛋白稳定且可控表达,制备技术简单易于实施,遗传稳定,是一种新品系的 uPA 转基因小鼠。

综上所述,本研究采用 CRISPR/Cas9 技术,构建了含有 pTight-uPA-pA-Alb promoter-rtTA-pA 目的表达框的转基因小鼠。表达框中的 Tet-on 能够调控 uPA 基因的表达,克服了以往 uPA 小鼠肝脏出血而死的难题,使人源肝细胞移植成为可控。新构建的转基因小鼠通过强力霉素诱导 uPA 表达,造成肝脏亚急性损伤,并通过人源肝癌细胞移植修复损伤进而构建人源化肝细胞嵌合小鼠。该模型小鼠的建立为深入研究嗜肝病毒感染机制、评价抗病毒治疗性药物/疫苗疗效提供了新的适宜的实验动物模型。

志谢 感谢陆军军医大学动物研究所魏弘教授、王勇主任、周小杨博士、蒋先洪老师在实验过程中的大力支持和帮助

参考文献:

[1] LÜTGEHETMANN M, MANCKE L V, VOLZ T, *et al*. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation[J]. Hepatology, 2012, 55(3): 685-694. DOI: 10.1002/hep.24758.

[2] HECKEL J L, SANDGREN E P, DEGEN J L, *et al*. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator[J]. Cell, 1990, 62(3): 447-456. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90010-C.

[3] DANDRI M, BURDA M, TÖRÖK É, *et al*. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus[J]. Hepatology, 2001, 33(4):981-988. DOI: 10.1053/jhep.2001.23314.

[4] MERCER D F, SCHILLER D E, ELLIOTT J F, *et al*. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers[J]. Nat Med, 2001, 7(8): 927-933. DOI: 10.1038/90968.

[5] BAI J S, LI J G, MAO Q. Construction of a single lentiviral vector containing tetracycline-inducible Alb-uPA for transduction of uPA expression in murine hepatocytes[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61412. DOI: 10.1371/journal.pone.0061412.

[6] SONG X J, GUO Y S, DUO S G, *et al*. A mouse model of inducible liver injury caused by Tet-on regulated urokinase for studies of hepatocyte transplantation[J]. Am J Pathol, 2009, 175(5): 1975-1983. DOI: 10.2353/ajpath.2009.090349.

[7] LEVANDER S, SÄLLBERG M, AHLÉN G, *et al*. A non-human hepadnaviral adjuvant for hepatitis C virus-based genetic vaccines[J]. Vaccine, 2016, 34(25): 2821-2833. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.04.030.

[8] YANG D, LIU L C, ZHU D M, *et al*. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy[J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1):71-78. DOI: 10.1038/cmi.2013.43.

[9] ABBASI F, KODANI M, EMORI C, *et al*. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals *Oosp* family genes are dispensable for female fertility in mice[J]. Cells, 2020, 9(4): 821. DOI: 10.3390/cells9040821.

[10] HARA S, TAMANO M, YAMASHITA S, *et al*. Generation of mutant mice *via* the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11221. DOI: 10.1038/srep11221.

[11] SHEN B, ZHANG J, WU H, *et al*. Generation of gene-modified mice *via* Cas9/RNA-mediated gene targeting[J]. Cell Res, 2013, 23(5): 720-723. DOI: 10.1038/cr.2013.46.

[12] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, *et al*. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.

[13] MEULEMAN P, LEROUX-ROELS G. The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV[J]. Antivir Res, 2008, 80(3): 231-238. DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.07.006.

[14] GUO J L, LI Y, SHAN Y H, *et al*. Humanized mice reveal an essential role for human hepatocytes in the development of the liver immune system[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 1-10. DOI: 10.1038/s41419-018-0720-9.

[15] DOUGLAS D N, KNETEMAN N M. Mice with chimeric human livers and their applications[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1911:459-479. DOI: 10.1007/978-1-4939-8976-8_32.

[16] HWANG J R, PARK S G. Mouse models for hepatitis B virus research[J]. Lab Animal Res, 2018, 34(3): 85-91. DOI: 10.5625/lar.2018.34.3.85.

[17] LI S Y, LING C, ZHONG L, *et al*. Efficient and targeted transduction of nonhuman primate liver with systemically delivered optimized AAV3B vectors[J]. Mol Ther, 2015, 23(12): 1867-1876. DOI: 10.1038/mt.2015.174.

[18] GUTTI T L, KNIBBE J S, MAKAROV E, *et al*. Human hepatocytes and hematolymphoid dual reconstitution in treosulfan-conditioned uPA-NOG mice[J]. Am J Pathol, 2014, 184(1): 101-109. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.09.008.

[19] STRICK-MARCHAND H, DUSSÉAUX M, DARCHE S, *et al*. A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119820. DOI: 10.1371/journal.pone.0119820.

[20] WEFERS B, BASHIR S, ROSSIUS J, *et al*. Gene editing in mouse zygotes using the CRISPR/Cas9 system[J]. Methods, 2017, 121/122: 55-67. DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.02.008.

[21] WU Y M, LUNA M J, BONILLA L S, *et al*. Characterization of knockin mice at the Rosa26, Tac1 and Plekhg1 loci generated by homologous recombination in oocytes[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0193129. DOI: 10.1371/journal.pone.0193129.

(收稿:2023-03-06;修回:2023-04-12)

(编辑 刘秋池)