

疾病小鼠模型系列之血友病篇

血友病为一组遗传性凝血功能障碍的出血性疾病，其共同的特征是活性凝血活酶生成障碍，凝血时间延长，终身具有轻微创伤后出血倾向，重症患者没有明显外伤也可发生“自发性”出血。根据凝血因子差异可分为由FVIII凝血因子功能异常导致的血友病A(hemophilia A, HA)与FIX凝血因子异常所致的血友病B(hemophilia B, HB)。

今年四月份，Sangamo和辉瑞公布了血友病A基因治疗1/2期临床中期数据，使血友病的基因疗法又向前推动了一步；早在2017年年底，辉瑞与Spark Therapeutics就公布了血友病B基因疗法SPK-9001的1/2期临床中期数据。此外，罕见病专业公司BioMarin也宣布今年下半年将会提交其血友病A基因疗法（valrox）的上市申请。

血友病为一组遗传性凝血功能障碍的出血性疾病，其共同的特征是活性凝血活酶生成障碍，凝血时间延长，终身具有轻微创伤后出血倾向，重症患者没有明显外伤也可发生“自发性”出血。**根据凝血因子差异可分为由FVIII凝血因子功能异常导致的血友病A(hemophilia A, HA)与FIX凝血因子异常所致的血友病B(hemophilia B, HB)**。流行病学调查结果显示，血友病A在男性人群中的发病率约为1/5000[1]，血友病B的发病率约为1/25000[2]；血友病A占总发病率的80%到85%。血友病作为一种血液性罕见病，患者极易出现躯体畸形，严重时甚至危及生命，然而尚无治愈的方法。作为一种单基因遗传性疾病，目前正在研究的基因治疗则具有治愈血友病的可能。在基因治疗的研究中，动物模型的应用是必不可少的基础支持条件。

因此，建立与人类血友病生物学特性和临床表征相近的动物模型，对于血友病发病机制的研究以及新型药物的开发具有重要的意义。继前几期的肿瘤模型后，今天小编就给大家简单介绍一下小鼠血友病模型的发展历程及现状。

血友病哺乳动物模型的初现

第一例血友病模型形成于上世纪七八十年代，科学家发现狗因体内编码FIX因子的基因突变导致该凝血因子活性丧失，其发病机制及临床病理表现与人类HB极为类似。20世纪末，Monahan指出这种天然的血友病犬模型可以用于基因治疗的临床前动物试验[3]。同时，国内外科学家利用ES细胞打靶的方式获得了血友病HA小鼠模型和血友病HB小鼠模型。



血友病大、小鼠模型的发展

随着基因编辑技术的不断发展，Nielsen在2014年运用ZFN锌指核酸酶技术构建了血友病大鼠模型，相比于血友病小鼠模型，其采血量及自发性出血等方面的问题得以改善^[4]。随后，科学家相继运用该大鼠模型进行了血友病疾病等方面的深入研究。CRISPR-Cas9技术的应用极大的推动了基因功能的研究。科研工作者应用CRISPR-Cas9技术通过对小鼠F9因子第8外显子核心功能区进行定点编辑获得了小鼠血友病HB模型^[5]。

2016年，模拟病人突变的点突变小鼠F9Y381D构建成功，同时还成功制备了F9Y381S突变小鼠及第383位氨基酸突变为终止密码子的敲除小鼠F9383STOP^[6]。同年，F8因子敲除即HA小鼠模型也被成功构建^[7]。血液病小鼠模型的成功构建极大的推动了血友病的研究。

Tab.1 血友病动物模型汇总^[8]

Species	Strain	Genotype	Reference
Mouse	Hemophilia A	exon 16 knockout	Bi et al. 1995
	• C57BL/129		Bi et al. 1995
	• BALB/c		Waters et al. 2009
	• CD4-deficient		Sabatino et al. 2010
Mouse	Hemophilia A	exon 17 knockout	Bi et al. 1995
Mouse	Hemophilia A	Transgenic for human F.VIII with missense mutation R593C; exon 17 knockout	Bril et al. 2006
Mouse	Hemophilia A	Transgenic for human MHC II allele HLADRB1* 1501; exon 17 knockout	Reipert et al. 2009
Mouse	Hemophilia B	Targeted deletion	Lin et al. 1997
	• C57BL/6		Mingozzi et al. 2003
	• BALB/c		Mingozzi et al. 2003
	• C3H/HeJ		Mingozzi et al. 2003
	Hemophilia B	Knock-in for human F.IX with crm+ missense mutation R333Q	Jin et al. 2004
	Hemophilia B	Knock-in for human F.IX with early stop codon at amino acid residue 29	Hu et al. 2010
Mouse	Hemophilia B (C57BL/6 or C3H/HeJ)	Targeted deletion plus transgenic for human F.IX: • crm- missense mutation G381E • crm+ missense mutation R180W • Early stop codon at residue 29 • Late stop codon at residue 338	Sabatino et al. 2004 Cao et al. 2009
Rat	Hemophilia A	Missense mutation L176P	Booth et al. 2010
Dog	Hemophilia A (Chapel Hill)	Exon 22 inversion	Graham et al. 1949 Lozier et al 2002
Dog	Hemophilia A (Queens)	Exon 22 inversion	Hough et al. 2002
Dog	Hemophilia A (Alabama)	unknown	Connelly et al. 1996
Dog	Hemophilia B (Chapel Hill)	CRM- missense mutation G379E	Evans et al. 1989
Dog	Hemophilia B (Alabama)	Partial deletion/early stop codon/low mRNA	Mauser et al. 1996
Sheep	Hemophilia A	Early stop codon/frameshift	Porada et al. 2009

根据客户需求，南模生物自主研发了F8与F9基因敲除小鼠模型！

FVIII基因敲除小鼠模型

人的FVIII基因位于X染色体上，全长186kb，由26个外显子组成。临床研究表明，血友病A主要是由于FVIII基因的点突变、基因倒置、小段基因的缺失和插入造成的。南模生物自主研发的FVIII基因敲除小鼠是在小鼠胚胎干细胞（SCR012，来源于129S6/SVEV）上以同源重组方式造成内源FVIII基因序列部分缺失（16~19外显子），进而通过四倍体补偿技术获得完全胚胎干细胞来源的FVIII基因敲除小鼠，该小鼠进一步与C57BL/6J小鼠交配育种。

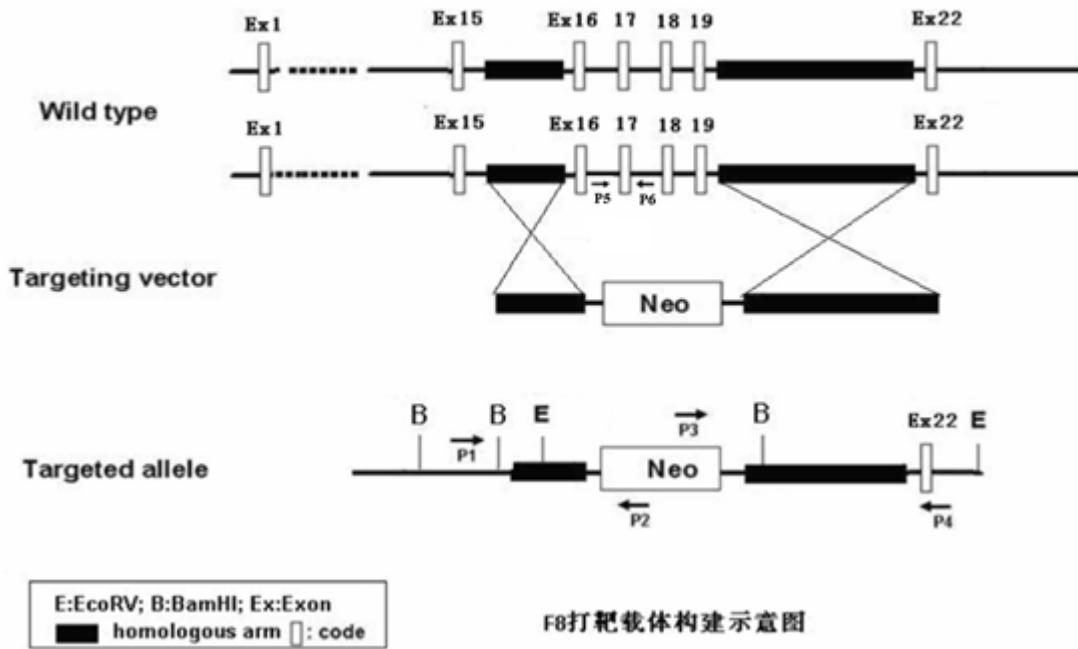


Fig.2 FVIII基因敲除小鼠构建策略示意图；利用ES打靶的技术，用Neo基因替换FVIII基因的16-19外显子。

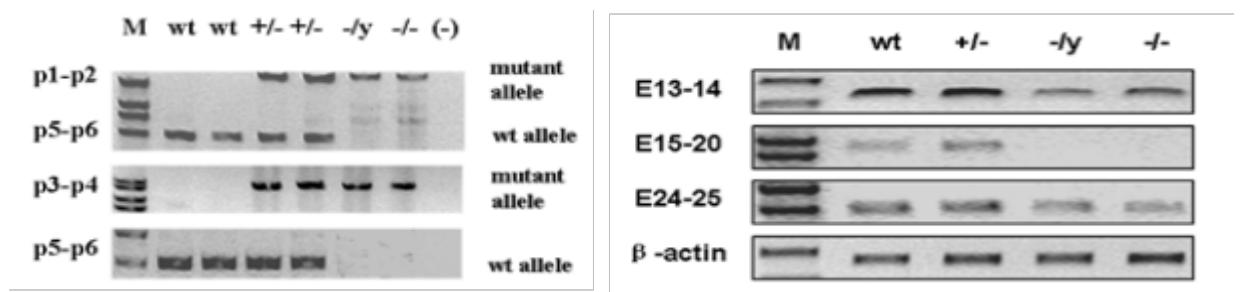


Fig.3 FVIII基因敲除小鼠基因型鉴定

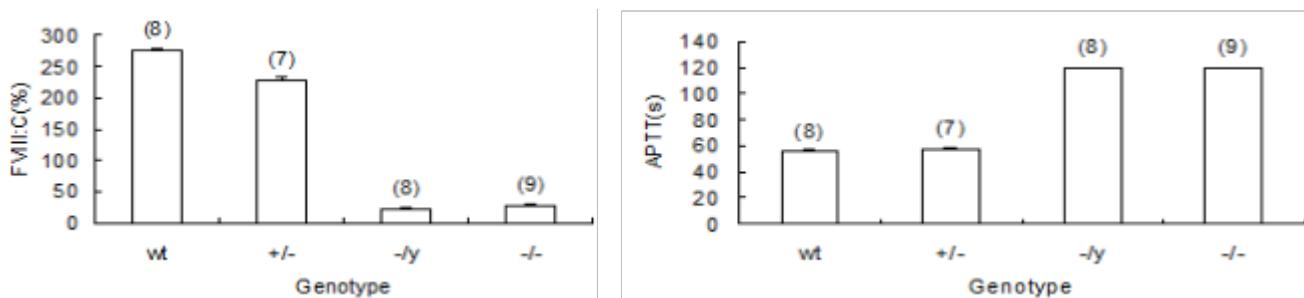


Fig.4 A. FVIII基因敲除小鼠FVIII活性检测；雄性杂合子（-/y）和雌性纯合子（-/-）小鼠的FVIII活性仅为野生型（wt）小鼠的8%和10%，而雌性杂合子小鼠的活性为野生型小鼠的80%。B. FVIII基因敲除小鼠APTT（凝血活酶时间）检测；雌性杂合子小鼠的APTT时间比野生型小鼠的略有延长，而雄性杂合子（-/y）和雌性纯合子（-/-）小鼠的APTT值均大于120秒。

FVIII基因敲除小鼠是在整体动物水平研究血友病A发病机制和药物筛选的理想动物模型，该小鼠模型具有明确的血友病A症状。饲养时需注意同笼小鼠间争斗可能导致小鼠内出血甚至死亡，剪尾后必须采取及时的止血措施，防止敲除纯合子小鼠失血和死亡。

FIX基因敲除小鼠模型

人的FIX基因位于X染色体上，全长31kb，由8个外显子组成。南模生物通过CRISPR/Cas9技术编辑FIX基因，造成蛋白翻译移码突变并提前终止。

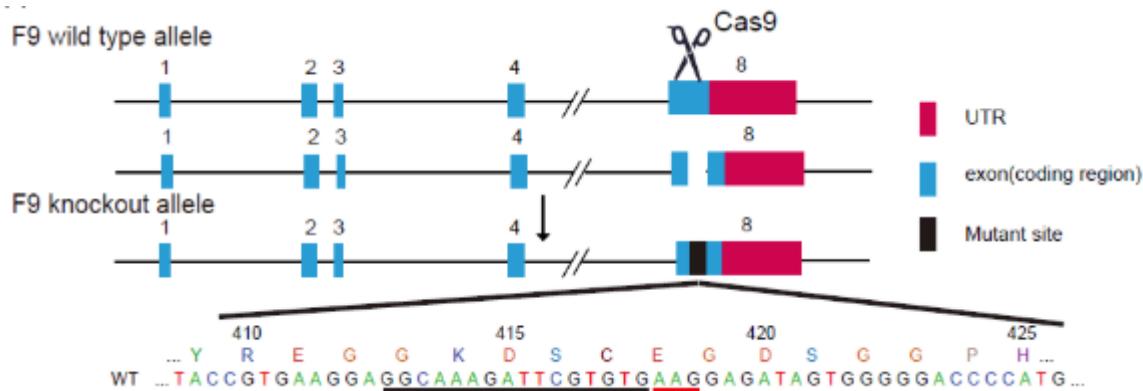


Fig.5 F9因子敲除小鼠构建策略图；利用CRISPR基因编辑技术，针对小鼠F9基因exon8设计gRNAs，获得F9基因敲除小鼠模型。

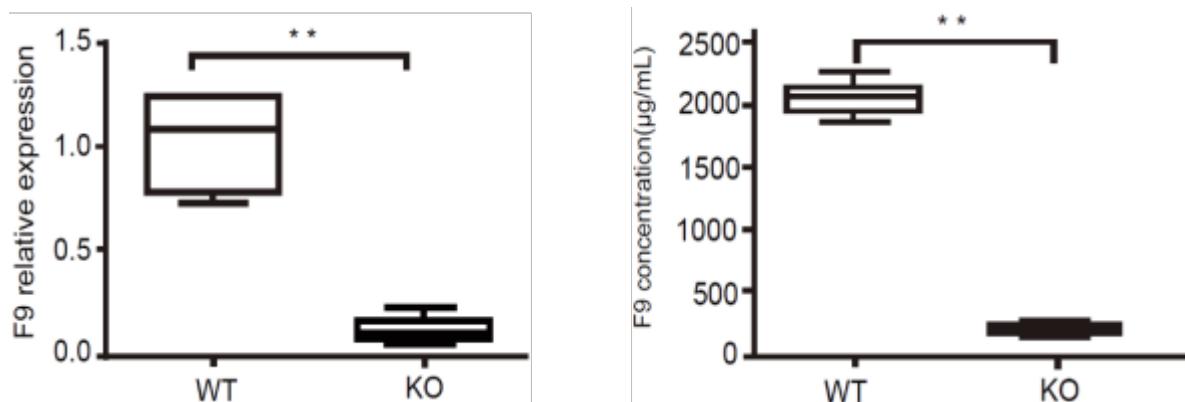


Fig.6 A. 肝组织中F9基因的表达；纯合突变小鼠的肝脏中F9因子的表达显著性降低。B. 血浆中FIX蛋白的浓度，纯合突变小鼠的血浆中F9因子的浓度显著性降低。

FIX基因敲除小鼠是血友病B治疗药物的筛选和评价及血友病B基因治疗的理想动物模型。F9基因敲除纯合子小鼠可正常发育、存活、繁育。饲养时同样需要注意敲除纯合子本身出血的倾向性，放于单笼精心喂养。

如果您有血友病小鼠模型方面的需求，欢迎随时咨询！！！

参考文献：

- Callan MB, Haskins ME, Wang P, et al. Successful phenotype improvement following gene therapy for severe hemophilia A in privately owned dogs [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151800.

2. World Federation of Hemophilia. Report on the annual global survey 2012 [M]. Montreal: WFH, 2013, 10.
3. Monahan PE, Samulski RJ, Tazelaar J, et al. Direct intramuscular injection with rAAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia [J]. Gene Ther, 1998, 5(1): 40-49.
4. Nielsen LN, Wiinberg B, Häger M, et al. A novel F8 -/- rat as a translational model of human hemophilia A [J]. J Thromb Haemost, 2014, 12(8):1274-82.
5. 汪启翰, 怀聪, 孙瑞林等. 利用CRISPR/Cas系统快速高效构建血友病乙小鼠模型[J]. 遗传, 2015, 37 (11) : 143-148.
6. 关玉婷. CRISPR-Cas9技术在B型血友病小鼠模型构建及治疗的应用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
7. 常士伟. 利用TALEN和CRISPR/Cas9技术构建甲型血友病小鼠模型[D]. 南京: 南京师范大学, 2016.
8. Denise ES, Timothy CN, Elizabeth M, et al. Animal Models of Hemophilia [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012; 105: 151-209.