



于士颜, 医学博士, 研究员, 博士生导师, 现任上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院黏膜屏障与宿主微生物互作课题组长。2011—2019年受美国克罗恩病及肠炎基金、新泽西州博士后基金等资助, 利用遗传工程小鼠模型, 研究消化道黏膜屏障发育、修复及其相关疾病, 在小肠上皮细胞极化与再生、肠上皮细胞与肠道微生物互作、肠道黏膜免疫等方面取得一些发现, 相关成果发表于 *Immunity* (2020)、*Cell Stem Cell* (2018)、*EMBO J* (2014) 等期刊。2019年回国后加盟上海精准医学研究院, 入选2021年上海市海外高层次人才项目。目前课题组主要研究方向为利用遗传工程小鼠模型与高通量组学技术开展消化道黏膜屏障生理与病理生理等研究。

小鼠模型在消化道黏膜免疫及感染性疾病研究中的应用进展

于士颜^{1,2}

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院上海精准医学研究院, 上海 200125; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院肿瘤科, 上海 200125)

[摘要] 机体的消化道黏膜定殖着巨量的共生微生物, 这些微生物通过与宿主相互作用, 影响宿主的健康与疾病。近年来, 随着高通量测序与培养组学等技术的发展, 大量与健康或疾病相关但以前未充分研究的微生物被鉴定出来。研究这些微生物对宿主黏膜免疫生理与病理生理的影响及相关分子机制, 对防治相关疾病具有重要意义。小鼠模型是系统性研究宿主与微生物相互作用的重要平台。本文介绍近年来利用小鼠模型在消化道黏膜免疫及感染性疾病研究中的部分重要进展与挑战, 并展望综合利用遗传工程与菌群移植或环境暴露等优化小鼠模型的研究前景, 以期促进与微生物紧密相关的健康与疾病的转化研究。

[关键词] 小鼠模型; 菌群; 宿主微生物互作; 黏膜免疫; 感染性疾病

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)01-0003-08

Advances in the Application of Mouse Models to Study Digestive Mucosal Immunity and Infectious Diseases

YU Shiyuan^{1,2}

(1. Shanghai Institute of Precision Medicine, 9th Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai 200125, China; 2. Oncology Unit, the 9th Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai 200125, China)

Correspondence to: YU Shiyuan, E-mail: yulab@sjtu.edu.cn

[ABSTRACT] The host digestive tract comprises trillions of commensal microbes, collectively called microbiota. These microbes interact with a various host cell types and have a significant impact on health and disease. High-throughput sequencing technologies have accelerated the identification of numerous poorly studied microbes associated with health and disease. Genetic and humanized mouse models with and without environmental exposure were established to study the roles of these microbes in human physiologies and pathologies. Important findings related to the microbiota, mucosal immunity, and infectious diseases in mouse models are summarized. Furthermore, challenges and opportunities in leveraging genetic approaches and environmental exposure to optimize mouse models are discussed.

[Key words] Mouse model; Microbiota; Host-microbial interactions; Mucosal immunity; Infectious disease

[基金项目] 上海交通大学医学院附属第九人民医院人才启动项目(XK2019007); 上海高水平地方高校创新团队项目(SHSMU-ZLCX20211700)

[作者简介] 于士颜(1981—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 消化道黏膜屏障发育、修复及其相关疾病。E-mail: yulab@sjtu.edu.cn

微生物在地球生命圈内无处不在,在微观尺度上形成动态演化的微生态系统,它能适应并改造自然环境,同时参与宏观生态系统的生化分子循环、能量传递,甚至遗传信息交换。致病性微生物可以在物种内甚至物种间播散,造成传染性疾病;同时,高致死性传染性疾病加重了物种进化筛选压力,甚至影响物种存亡^[1]。除自养微生物外,许多微生物需要寄居于宿主提供的特定空间内,并与宿主相互作用(简称互作)以适应环境演化。人体黏膜表面定殖着上百兆级微生物,与人体形成稳定的共生关系^[2]。这种共生关系对宿主健康与疾病等生理病理活动产生重要影响^[3]。一方面,共生微生物形成的稳定生态有助于抑制其他致病病原体的侵入,同时通过其代谢次生产物与其固有模式组分共同刺激宿主免疫系统发育、成熟,从而调节人体各组织器官的生理功能及免疫稳态^[4-5]。另一方面,西方化饮食与不良生活习惯诱导菌群生态紊乱,可造成携带易感基因的宿主免疫系统异常活化,进而诱发免疫相关性疾病。另外,有些饮食经肠道菌群处理后可产生有毒性的代谢产物,毒性物质可促进代谢相关性疾病甚至肿瘤的发生^[6-7]。不少病原微生物亦可利用共生菌群创造的生态环境,促进该病原体定殖并破坏宿主屏障,从而造成感染发生^[8-11]。

以前由于微生物培养条件与手段有限,大部分微生物的功能研究均未得到充分开展。近年来借助高通量测序技术与生物信息学高级算法,特定微生物与宿主正常免疫生理以及相关疾病的相关性研究取得了不少重要进展^[12]。而研究宿主与微生物互作对宿主生理与病理生理的影响,探寻因果关系,常需要借助模式生物。根据微生物定殖的自然宿主谱,可以从果蝇、线虫等低等生物到小鼠、豚鼠等啮齿类动物,以及灵长类动物等来选择模式生物^[13]。本文将介绍近年来利用小鼠模型在消化道黏膜免疫及感染性疾病研究中的部分重要进展与挑战,并对未来如何整合小鼠资源与环境暴露等要素提出观点,便于更好地认识人与微生物互作对人类健康与疾病的影响及其机制。

1 小鼠模型在黏膜免疫与感染性疾病研究中的应用进展

影响人类健康与疾病的某些微生物可以跨物种定殖,而有些微生物,尤其是病原微生物,仅能感染人类等有限种属,这为选择合适的模式动物带来了挑战。相对其他动物模型,小鼠作为模式动物的基础研究相对更加充分,很多宿主与微生物互作研究的突破性发

现都源于对小鼠资源的合理应用,如小鼠模型在推动肠道菌群与黏膜免疫研究中发挥了关键性作用。即便许多微生物在自然状况下不依赖小鼠作为宿主,但是借助基因工程与人源化策略,小鼠依然可以作为重要的在体研究平台,可用于模拟宿主与微生物互作的部分环节,从而促进相关疾病机制的研究。

1.1 环境暴露对小鼠免疫系统生理与病理的影响

微生物暴露对小鼠免疫生理发育成熟发挥重要作用^[14]。无菌小鼠的免疫系统极不成熟,但移植正常肠道菌群后可诱导外周免疫系统成熟,表现为外周免疫细胞类型更加丰富且数量增大。无特定病原体(specific pathogen free, SPF)小鼠的免疫系统类似于人类幼年阶段,由于能免于常见的致病性微生物暴露,其活化的免疫细胞与记忆性淋巴细胞数量相对较少^[15]。而自然界或宠物店获得的小鼠(dirty/wild mice,即脏鼠/野生鼠)免疫活动更接近于成年人,表现为组织内免疫反应活跃,记忆性免疫细胞显著增多,抗体种类与丰度明显增加^[16]。将实验室小鼠接触脏鼠或者后者污染的垫料,甚至将实验室小鼠胚胎转移到野外捕获的假孕雌鼠体内,均可诱导实验室小鼠产生类似脏鼠的免疫表型^[16-17]。同样,将SPF级小鼠序贯性感染疱疹病毒、流感病毒与肠道钩虫后,发现其外周血基因表达谱与成人外周血基因表达谱十分相似^[15]。新近有研究将不同基因型SPF级实验室小鼠置于自然环境下重新野化(rewilding),发现环境暴露是不同个体间血液免疫细胞群变异的首要诱因,而基因型不同更容易造成个体间细胞因子产生差异^[18]。将野外小鼠肠道菌群移植给实验室小鼠,可以减少炎症反应强度,降低实验室小鼠经流感病毒攻击后的死亡率,降低由诱变剂氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)与致炎剂葡聚糖硫酸钠(dextran sulphate sodium, DSS)处理诱发结直肠癌的肿瘤负荷^[19]。更重要的是,研究发现利用脏鼠作为临床前疫苗评估模型,相对于SPF级小鼠更接近人群对疫苗的反应性,提示前者可能是更好的药效评估策略^[15, 20]。另外,不同环境暴露还可能影响微生物与宿主免疫系统互作的病理表现。例如,有研究发现鼠诺如病毒感染无菌小鼠可诱导I型干扰素产生,促进黏膜免疫成熟^[21];而感染SPF小鼠则诱导产生肿瘤坏死因子等,在炎症肠病易感小鼠模型上出现组织病理性改变^[22]。牙龈普林单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)是牙周病主要致病菌,感染SPF级小鼠可模拟人牙周病临床表型,而感染无菌小鼠却未能诱导牙周病发生^[23]。因此,利用小鼠模型研

究人类生理与疾病时需要考虑环境变量对小鼠免疫表型的影响,并在此基础上合理控制环境暴露以期更好地模拟人体免疫反应,为揭示临床相关疾病机制并探讨防治策略提供高转化价值的研究数据。

1.2 小鼠模型在肠道菌群与黏膜免疫及相关疾病研究中的应用

现代小鼠与人类社会的寄生关系可追溯至约15 000年前的人类农耕文明时期^[24]。上万年来,小鼠饮食结构与人类食谱高度重叠,而且暴露在相似的自然环境,造成其肠黏膜内环境与人类相似,因此小鼠模型成为研究人类肠道菌群生理与病理功能的较为理想的模式动物。研究发现人类肠道菌群内上千种不同菌种经体外培养后,仅能测出约60%的种属,而转移至无菌鼠肠道内定殖则可检出约90%左右^[25],显示小鼠模型在研究大量不可培养微生物构成的复杂肠道微生态中的巨大优势。

利用小鼠模型研究发现,菌群定殖并与宿主黏膜屏障组成细胞互作对黏膜屏障功能至关重要。小鼠出生后,在其口腔、肠道中微生物序贯定殖,可诱导黏膜上皮细胞表达更多的细胞连接蛋白,从而促进形成更强的细胞间连接,同时上调细胞因子、趋化因子等以招募免疫细胞归巢,参与抵抗微生物侵入,逐步建立屏障功能^[26-27]。黏膜上皮细胞在黏膜免疫屏障中承担着关键角色^[28]。上皮细胞一方面可以分泌抗菌肽、黏液以及上皮间紧密连接等区隔腔内微生物,另一方面与固有层免疫细胞交流以调控免疫方向与活跃度。遗传工程小鼠模型即基因修饰小鼠模型(genetic modified mouse models)在鉴定不同上皮细胞功能的研究中体现出重要价值。Hansson 博士研究小组通过RedMUC2-98trTg转基因小鼠模型,在体实时示踪黏蛋白释放,可鉴定出能响应微生物组分并迅速释放黏液蛋白的哨兵杯状细胞^[29]。Locksley 博士研究小组通过对白细胞介素25(interleukin 25, IL-25)原位敲入红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)基因获得Flare25小鼠模型,发现组成性表达IL-25的簇细胞(Tuft细胞)是宿主感知胃肠微生物及其代谢产物并触发小肠2型免疫反应的启动细胞^[30-31]。利用潘氏细胞溶菌酶敲除小鼠模型,研究发现潘氏细胞溶菌酶是肠腔溶菌酶的主要来源,溶菌酶可以调节肠道菌群组成,通过核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide oligomerization domain, NOD)样信号通路影响肠道黏膜的免疫状态。溶菌酶缺陷小鼠肠道菌群中Gram阳性菌的比例显著上升,尤其是嗜黏液菌显著扩增,并激

活肠道2型黏膜反应,诱导杯状细胞增生,从而分泌更多黏液蛋白,以补偿溶菌酶缺陷造成的屏障功能下降^[32]。Reg III是另一类肠上皮细胞分泌的抗菌多肽,敲除该基因可造成肠上皮细胞与肠腔微生物物理区隔受损,诱导大量的IgA⁺细胞和 γ -干扰素阳性(interferon γ -positive, IFN γ ⁺) Th1细胞^[33]。

在黏膜特异性免疫研究中,利用小鼠模型已鉴定了大量可诱导特定免疫类型的微生物或微生物组合,深刻揭示了微生物在诱导外周免疫分化成熟中的关键作用。通过比较不同来源小鼠表型与肠道菌群组成差异,研究发现分节丝状菌(segmented filamentous bacteria, SFB)锚定肠上皮细胞可诱生血清淀粉样蛋白A1-3(serum amyloid A protein 1-3, SAA1-3),进而诱导ROR γ ⁺T细胞表达IL-17^[34-37]。另外,过表达人防御素 α 5(defensin α 5)可以显著抑制肠道菌群丰度,从而降低肠黏膜IL-17的表达^[38]。进一步通过比较大鼠来源与小鼠来源SFB分别对大鼠与小鼠肠道Th17细胞的诱导能力,发现微生物锚定在上皮细胞表面即可诱导SAA1-3表达。同样能够黏附肠上皮细胞的致病病原体如*Citrobacter rodentium*、EHEC O157:H7等均可诱导Th17功能。另有研究报告,利用相同策略,肠道共生菌*Lactobacillus reuteri*可通过色氨酸代谢衍生物激活AhR信号通路,诱生CD8 α ⁺上皮细胞内淋巴细胞^[39];并且证实小鼠肠道共生寄生虫*Tritrichomonas muris*与肠道菌群均可通过肠上皮细胞激活2型肠黏膜免疫^[40-41]。利用抗生素/氯仿处理小鼠肠道菌群并监测直肠黏膜固有层中Treg细胞的变化,鉴定并分离出*Clostridia* IV与XIV亚群,这些亚群具有诱导直肠Treg细胞的功能;进一步借助代谢组学分析发现,这些亚群合成的短链脂肪酸可诱导直肠Treg细胞分化^[42-44]。新近有研究将人肠道菌群定殖于无菌小鼠,并从具有氨苄抗性的细菌亚群中筛选到11株菌组合,这些肠道菌种组合可诱生IFN γ ⁺CD8⁺T细胞,从而增强宿主清除细胞内感染的能力,发挥抗肿瘤免疫作用^[45]。因此,上述发现为探索利用相关菌株调控免疫功能,从而防治相关疾病,提供了新思路。

临床研究发现许多疾病与菌群生态失调紧密相关^[46]。炎性肠病是典型的由肠道菌群生态失调与易感基因携带宿主之间发生病理性互作所导致的疾病,目前研究认为其发病原因是工业化食品加工与添加剂使用急速改变了肠道菌群生态,造成携带易感基因的宿主黏膜免疫系统病理性识别肠道菌群,诱发肠道屏障功能严重受损,并启动恶性循环^[47]。通过大样本全基

基因组关联分析 (GWAS), 目前已鉴定出超过 300 个炎性肠病易感基因^[48-51]。通过敲除这些基因, 或采用定点突变技术引入炎性肠病易感的突变, 构建炎性肠病小鼠模型, 可以在功能学水平上验证这些基因在肠黏膜免疫与炎性肠病发生过程中的作用。*NOD2* 是首个被鉴定的炎性肠病易感基因。研究发现, *NOD2* 基因敲除小鼠肠上皮细胞中杯状细胞数量减少, 细胞内黏液蛋白分泌囊泡也减少, $\text{IFN}\gamma^+$ 上皮内淋巴细胞水平升高, 同时肠道菌群生态失调, 多样性受损, 诱导病理性损伤条件致病菌如 *Bacteroides vulgatus* 的丰度上调; 而单独定植 *B. vulgatus* 于甲硝唑预处理后的 *NOD2* 基因缺陷小鼠, 可以再次诱导出相似的病理表型^[52]。将炎性肠病患者的肠道菌群移植给无菌小鼠, 可诱导更多的 Th2 与 Th17 细胞, 而健康对照肠道菌群诱导更多的 $\text{ROR}\gamma^+$ Treg 细胞; 而且在肠炎模型中, 前者比后者更容易诱导严重的组织损伤^[53], 这揭示了生态失调的肠道菌群在炎性肠病中发挥病理生理作用。

1.3 小鼠模型在感染性疾病研究中的应用

对于人鼠共患病原微生物, 小鼠模型可以直接用于感染模型构建。例如, 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 感染可造成人腹泻、发热等症状, 小鼠感染亦出现相似表型^[54]。而可造成人类伤寒热的伤寒沙门菌 (*Salmonella enterica serovars typhi*, *S. typhi*) 并不能感染野生型小鼠。但是, 有研究发现 Toll 样受体 Tlr11 缺陷小鼠模型 (Tlr11 敲除小鼠模拟人类 Tlr11 基因缺陷) 对 *S. typhi* 易感, 并可出现人类伤寒病表型。利用灭活 *S. typhi* 疫苗免疫 Tlr11 缺陷小鼠, 可以帮助小鼠产生特异性免疫, 抵抗 *S. typhi* 再感染^[54]。同样, 利用 I 型干扰素受体 (interferon- α receptor 1, IFNAR1) 缺陷小鼠也能较好地模拟寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 感染造成的病理性损伤^[55]。利用 I 型与 II 型干扰素受体联合缺陷的 AG129 小鼠可以模拟同属黄热病属的登革热病毒感染造成的临床表型^[56]。因此, 对人兽共患病原微生物研究, 可以首先尝试野生型或者天然免疫反应缺陷型小鼠, 然后通过检测病理指标, 评估是否满足模拟感染需求。

有些病原微生物侵入宿主时依赖人特异性感染受体, 小鼠由于外显子进化与人的同源基因在蛋白序列上存在变异, 尤其是结合位点突变严重影响小鼠与病原微生物的亲合力。这种情况下, 需要借助基因工程技术或人源化策略改造小鼠。比如, 诱发败血症脑膜炎等临床表现的李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*), 经粪口途径感染时依赖人肠上皮 E-Cadherin, 其中第 16

位脯氨酸至关重要。小鼠由于外显子进化, 第 16 位脯氨酸替换为谷氨酸, 从而失去了结合内化素 (internalin) 的能力。为此, 有研究利用大鼠肠上皮特异性 FABP 启动子驱动人 E-Cadherin 表达质粒, 构建转基因小鼠模型, 诱导小鼠肠上皮细胞过表达人 E-Cadherin, 从而使得该小鼠对李斯特菌产生易感性^[57]。同样, 为研究冠状病毒 SARS-CoV、COVID-19 感染, 构建了 K19-hACE2 与 mAce2-hACE2 转基因小鼠, 让冠状病毒感染受体即人源 ACE2 相对特异性表达于上皮细胞或鼠内源性 mAce2 表达细胞中^[58-59]。这些小鼠模型一定程度上可以模拟冠状病毒感染, 病理学检测肺等组织均可检出病毒蛋白表达、免疫炎性细胞浸润、组织结构破坏等病理表型^[58-59]。

有些病原微生物的宿主嗜好性体现在: 即便提供感染受体、改变小鼠基础免疫状态, 依然不能形成有效感染, 推测其生活史多个环节可能依赖人源细胞或人特异性基因的参与。对于这类病原微生物感染在体研究, 人源化是相对适当的策略。早期利用人源外周血单核细胞、富含 CD34⁺ 造血干细胞的骨髓或胎肝人源化小鼠, 可促进对人免疫缺陷病毒、登革热病毒、疟原虫等感染的研究^[60-62]。对于靶向非血源性细胞的病原微生物, 研究这类病原体与宿主互作可以将靶器官组织团块或含有靶细胞的类器官与人造血干细胞联合移植给免疫缺陷小鼠。例如肝炎病毒感染, 需要同时移植人源肝细胞^[63]。新近有研究报告, 在胸腺、胎肝联合移植的基础上, 将人源肺组织包埋于小鼠皮下, 可支持 MERS-CoV、RSV、HCMV 等呼吸道病毒感染, 并诱导出一定水平的特异性细胞免疫及体液免疫^[64]。

2 小鼠模型在宿主与微生物互作研究中的挑战

人体与微生物互作对人类健康与疾病产生重要影响, 但是其机制研究却受限于伦理与技术条件, 无法完整地在人体内进行相关研究, 因此大量实验动物模型包括各种品系的小鼠被开发出来。由于在 800 万年前小鼠与人已经分开进化, 这两个物种对环境的刺激反应必然带有物种特异性^[65-66]。因此, 源自小鼠模型的研究发现是否具有转化应用价值, 依然需要借助人源组织的多组学、大样本研究来验证。另外, 有些人类基因的同源基因在啮齿类动物基因组中已经失活, 对于这类基因参与的宿主微生物互作研究, 不建议采用小鼠模型 (甚至包括过表达该人类基因的转基因小鼠) 作为研究平台。

持续暴露于多样化组成的微生态群有助于小鼠建立类似成人的免疫反应。但是环境暴露很难精确控制微生物的组成与比例,也很难做到实时跟踪小鼠是否曾发生大量未知微生物感染,因此实验的可重复性经常受到挑战。如何标准化环境暴露因素依然有待探索,可能措施包括在多个时间点采集高通量数据,这无疑会明显增加实验成本。另外,小鼠模型接受人肠道菌群转移定殖,依然不能完全重现所有人类肠道微生物。因此,这些无法转移的微生物造成的表型变化很难在小鼠模型上看到。最后,不少肠道菌群诱导的宿主表型仍然需要在易感基因携带者体内才能重现。仅接受患者肠道菌群建立的野生型悉生小鼠(gnotobiotic mice)很可能难以重现类似表型,需要建立携带该易感基因的无菌鼠,这无疑再次增加了研究的时间成本。

在人源化小鼠构建中,由于组织相容性抗原不同,移植抗宿主免疫时常发生。另外,人源细胞或组织移植小鼠体内常由于鼠源细胞因子或表面配体受体,不能满足某些人源细胞增殖、分化、归巢等^[67]。因此,经过筛选存活的免疫细胞与免疫反应将出现偏倚,从而减弱实验结果的转化价值。此外,免疫联合缺陷小鼠由于缺乏LTi(lymphoid tissue inducer)细胞,造成二级淋巴结发育不良,人源免疫细胞很难有效利用这些淋巴组织以完成抗原特异性T或B细胞分化、增殖和成熟过程^[68]。为克服上述问题,需要修饰或沉默小鼠组织相容性抗原,让特定细胞类型表达人源分子,利用上皮特异性启动子驱动胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)过表达以刺激淋巴结发育^[69]等,这些也无疑增加了人源化的复杂度与成本。

3 总结与展望

3.1 利用无菌小鼠与悉生小鼠模型推进宿主微生物互动与宿主表型之间的因果关系研究

随着高通量测序技术不断成熟且成本下降,微生物菌群相关研究已经成为一个热点,大量的生理病理表型与菌群的相关性被一一建立。前期大部分研究集中在描述菌群组成,验证其与表型的相关性,但是在更精细的菌株水平上依据科赫法则(Koch postulates)鉴定造成表型的微生物或最小微生物组合将是下一阶段菌群研究的重要方向^[70]。由于从未接触任何微生物,无菌小鼠可以最大限度地排除背景微生物干扰,因此它是这类研究较理想的实验平台。采集表型相关菌群,大比例稀释后直接定植于无菌小鼠,或者经过

体外选择性培养获得单克隆菌株,然后再定植于无菌小鼠,从而建立悉生小鼠模型。通过比较定植前后小鼠表型的变化,可以揭示关键微生物与特定表型之间的因果关系。

3.2 丰富构建遗传工程小鼠模型与人源化小鼠模型的技术手段

构建携带类似人类易感基因突变的遗传工程小鼠,是在体研究相关疾病的重要手段。近年来,利用成簇规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)-CRISPR相关蛋白-(CRISPR-associated protein 9, Cas9)技术显著提高了包括同源重组在内的基因编辑发生概率,缩短了遗传工程小鼠模型的建构周期^[71]。基于CRISPR技术的单碱基修饰、引物编辑(prime editing)等为更精准的基因编辑提供了新手段^[72-74]。人源化是改造小鼠作为人与病原微生物互作研究平台的另一种重要策略。随着类器官3D培养技术的发展,多种人体组织块可以被分离、重悬在富含相应生长因子的培养体系内持续培养^[75]。另外,利用诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)持续定向诱导分化,亦可生长出组织类器官^[75]。将这些人类器官组织植入骨髓或胎肝、胸腺联合移植的小鼠皮下或相应脏器包膜下,可为靶向这些拟人类器官的微生物提供互作微环境。

3.3 合理利用基因组学与环境暴露建立更接近人类免疫反应的小鼠模型

构建更贴近人类对微生物反应性的小鼠模型,无疑是未来遗传工程小鼠模型研究的一个重要方向。随着功能基因组学的发展,小鼠与人类基因表达调控的规律将会被逐渐揭示。综合利用这些新知识,并借助合成生物学、系统生物学等手段,将有助于构建更加接近人体精准调控基因活动的遗传工程小鼠模型,并减少对基因组拓扑结构、非靶基因表达等的干扰。利用更精准的基因编辑工具,更高效地原位转换鼠源编码序列为人源编码序列,从而让小鼠获得相同的人类疾病基因易感性或病原微生物嗜好性。另外,随着多组学技术、大数据科学的发展,研究宿主与微生物互作的手段将会更加丰富。将这些多维数据与动物模型在体研究紧密结合,无疑会推动宿主与微生物互作相关研究,使人们更全面深入地认识微生物对人类健康与疾病的影响。

[利益声明] 作者声明本文不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. *Nature*, 2012, 484(7393):186-194. DOI:10.1038/nature10947.
- [2] GROUSSIN M, MAZEL F, ALM E J. Co-evolution and co-speciation of host-gut bacteria systems[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(1):12-22. DOI:10.1016/j.chom.2020.06.013.
- [3] CHO I, BLASER M J. The human microbiome: at the interface of health and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4):260-270. DOI:10.1038/nrg3182.
- [4] CLEMENTE J C, URSELL L K, PARFREY L W, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view [J]. *Cell*, 2012, 148(6):1258-1270. DOI:10.1016/j.cell.2012.01.035.
- [5] SOMMER F, BÄCKHED F. The gut microbiota: Masters of host development and physiology[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(4):227-238. DOI:10.1038/nrmicro2974.
- [6] FALONY G, VIEIRA-SILVA S, RAES J. Microbiology meets big data: the case of gut microbiota-derived trimethylamine[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2015, 69: 305-321. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104422.
- [7] DZUTSEV A, BADGER J H, PEREZ-CHANONA E, et al. Microbes and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35:199-228. DOI:10.1146/annurev-immunol-051116-052133.
- [8] FERREYRA J A, WU K J, HRYCKOWIAN A J, et al. Gut microbiota-produced succinate promotes *C. difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(6): 770-777. DOI: 10.1016/j.chom.2014.11.003.
- [9] NG K M, FERREYRA J A, HIGGINBOTTOM S K, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens[J]. *Nature*, 2013, 502(7469): 96-99. DOI:10.1038/nature12503.
- [10] JONES M K, WATANABE M, ZHU S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse Norovirus infection of B cells[J]. *Science*, 2014, 346(6210): 755-759. DOI: 10.1126/science.1257147.
- [11] BALDRIDGE M T, NICE T J, MCCUNE B T, et al. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection[J]. *Science*, 2015, 347(6219): 266-269. DOI:10.1126/science.1258025.
- [12] KUCZYNSKI J, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 13(1):47-58. DOI:10.1038/nrg3129.
- [13] KOSTIC A D, HOWITT M R, GARRETT W S. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(7):701-718. DOI:10.1101/gad.212522.112.
- [14] MASOPUST D, SIVULA C P, JAMESON S C. Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology[J]. *J Immunol*, 2017, 199(2):383-388. DOI:10.4049/jimmunol.1700453.
- [15] REESE T A, BI K, KAMBAL A, et al. Sequential infection with common pathogens promotes human-like immune gene expression and altered vaccine response[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(5):713-719. DOI:10.1016/j.chom.2016.04.003.
- [16] BEURA L K, HAMILTON S E, BI K, et al. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice[J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 512-516. DOI: 10.1038/nature17655.
- [17] ROSSHART S P, HERZ J, VASSALLO B G, et al. Laboratory mice born to wild mice have natural microbiota and model human immune responses[J]. *Science*, 2019, 365(6452): eaaw4361. DOI:10.1126/science.aaw4361.
- [18] LIN J D, DEVLIN J C, YEUNG F, et al. Rewilding Nod2 and Atg16l1 mutant mice uncovers genetic and environmental contributions to microbial responses and immune cell composition[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(5): 830-840. e4. DOI:10.1016/j.chom.2020.03.001.
- [19] ROSSHART S P, VASSALLO B G, ANGELETTI D, et al. Wild mouse gut microbiota promotes host fitness and improves disease resistance[J]. *Cell*, 2017, 171(5): 1015-1028. e13. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.016.
- [20] FIEGE J K, BLOCK K E, PIERSON M J, et al. Mice with diverse microbial exposure histories as a model for preclinical vaccine testing[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(12):1815-1827. e6. DOI:10.1016/j.chom.2021.10.001.
- [21] KERNBAUER E, DING Y, CADWELL K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria[J]. *Nature*, 2014, 516(7529):94-98. DOI:10.1038/nature13960.
- [22] CADWELL K, PATEL K K, MALONEY N S, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine[J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1135-1145. DOI:10.1016/j.cell.2010.05.009.
- [23] HAJISHENGALLIS G, LIANG S, PAYNE M A, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement[J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(5): 497-506. DOI: 10.1016/j.chom.2011.10.006.
- [24] WEISSBROD L, MARSHALL F B, VALLA F R, et al. Origins of house mice in ecological niches created by settled hunter-gatherers in the Levant 15, 000 y ago[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(16):4099-4104. DOI:10.1073/pnas.1619137114.
- [25] GOODMAN A L, KALLSTROM G, FAITH J J, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(15): 6252-6257. DOI: 10.1073/pnas.1102938108.
- [26] KOREN N, ZUBEIDAT K, SABA Y, et al. Maturation of the neonatal oral mucosa involves unique epithelium-microbiota interactions[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(2):197-209.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2020.12.006.
- [27] EARLE K A, BILLINGS G, SIGAL M, et al. Quantitative imaging of gut microbiota spatial organization[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(4):478-488. DOI:10.1016/j.chom.2015.09.002.
- [28] LARSEN S B, COWLEY C J, FUCHS E. Epithelial cells: liaisons of immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 62: 45-53. DOI: 10.1016/j.coi.2019.11.004.
- [29] BIRCHENOUGH G M H, NYSTRÖM E E L, JOHANSSON M E V, et al. A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion[J]. *Science*, 2016, 352(6293):1535-1542. DOI:10.1126/science.aaf7419.
- [30] SCHNEIDER C, O'LEARY C E, VON MOLTKE J, et al. A metabolite-triggered tuft cell-ILC2 circuit drives small intestinal remodeling[J]. *Cell*, 2018, 174(2): 271-284. e14. DOI:

- 10.1016/j.cell.2018.05.014.
- [31] VON MOLTKE J, JI M, LIANG H E, et al. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit[J]. *Nature*, 2016, 529(7585):221-225. DOI:10.1038/nature16161.
- [32] YU S Y, BALASUBRAMANIAN I, LAUBITZ D, et al. Paneth cell-derived lysozyme defines the composition of mucolytic microbiota and the inflammatory tone of the intestine[J]. *Immunity*, 2020, 53(2): 398-416. e8. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.010.
- [33] VAISHNAVA S, YAMAMOTO M, SEVERSON K M, et al. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine[J]. *Science*, 2011, 334(6053): 255-258. DOI: 10.1126/science.1209791.
- [34] IVANOV I I, ATARASHI K, MANEL N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria[J]. *Cell*, 2009, 139(3):485-498. DOI:10.1016/j.cell.2009.09.033.
- [35] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells[J]. *Cell*, 2006, 126(6):1121-1133. DOI:10.1016/j.cell.2006.07.035.
- [36] IVANOV I I, DE LLANOS FRUTOS R, MANEL N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(4):337-349. DOI:10.1016/j.chom.2008.09.009.
- [37] ATARASHI K, TANOUE T, ANDO M, et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells[J]. *Cell*, 2015, 163(2):367-380. DOI:10.1016/j.cell.2015.08.058.
- [38] SALZMAN N H, HUNG K, HARIBHAI D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(1):76-83. DOI:10.1038/ni.1825.
- [39] CERVANTES-BARRAGAN L, CHAI J N, TIANERO M D, et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4⁺ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ T cells[J]. *Science*, 2017, 357(6353): 806-810. DOI: 10.1126/science.aah5825.
- [40] HOWITT M R, LAVOIE S, MICHAUD M, et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut[J]. *Science*, 2016, 351(6279): 1329-1333. DOI: 10.1126/science.aaf1648.
- [41] LEI W W, REN W W, OHMOTO M, et al. Activation of intestinal tuft cell-expressed *Sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(21):5552-5557. DOI:10.1073/pnas.1720758115.
- [42] ATARASHI K, TANOUE T, OSHIMA K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota[J]. *Nature*, 2013, 500(7461): 232-236. DOI: 10.1038/nature12331.
- [43] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells[J]. *Nature*, 2013, 504(7480):446-450. DOI:10.1038/nature12721.
- [44] ATARASHI K, TANOUE T, SHIMA T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species[J]. *Science*, 2011, 331(6015):337-341. DOI:10.1126/science.1198469.
- [45] TANOUE T, MORITA S, PLICHTA D R, et al. A defined commensal consortium elicits CD8⁺ T cells and anti-cancer immunity[J]. *Nature*, 2019, 565(7741): 600-605. DOI: 10.1038/s41586-019-0878-z.
- [46] LEVY M, KOLODZIEJCZYK A A, THAISS C A, et al. Dysbiosis and the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(4):219-232. DOI:10.1038/nri.2017.7.
- [47] KAPLAN G G, NG S C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(2): 313-321. e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.10.020.
- [48] KHOR B, GARDET A, XAVIER R J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2011, 474(7351):307-317. DOI:10.1038/nature10209.
- [49] JOSTINS L, RIPKE S, WEERSMA R K, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 119-124. DOI:10.1038/nature11582.
- [50] DE LANGE K M, MOUTSIANAS L, LEE J C, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease[J]. *Nat Genet*, 2017, 49(2):256-261. DOI:10.1038/ng.3760.
- [51] HUANG H L, FANG M, JOSTINS L, et al. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution [J]. *Nature*, 2017, 547(7662):173-178. DOI:10.1038/nature22969.
- [52] RAMANAN D, TANG M S, BOWCUTT R, et al. Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides vulgatus*[J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 311-324. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.015.
- [53] BRITTON G J, CONTIJOCH E J, MOGNO I, et al. Microbiotas from humans with inflammatory bowel disease alter the balance of gut Th17 and ROR γ t⁺ regulatory T cells and exacerbate colitis in mice[J]. *Immunity*, 2019, 50(1):212-224.e4. DOI:10.1016/j.immuni.2018.12.015.
- [54] MATHUR R, OH H, ZHANG D K, et al. A mouse model of *Salmonella typhi* infection[J]. *Cell*, 2012, 151(3):590-602. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.042.
- [55] LAZEAR H M, GOVERO J, SMITH A M, et al. A mouse model of zika virus pathogenesis[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(5): 720-730. DOI:10.1016/j.chom.2016.03.010.
- [56] SHRESTA S, SHARAR K L, PRIGOZHIN D M, et al. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability[J]. *J Virol*, 2006, 80(20):10208-10217. DOI:10.1128/JVI.00062-06.
- [57] LECUIT M, VANDORMAEL-POURNIN S, LEFORT J, et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier[J]. *Science*, 2001, 292(5522): 1722-1725. DOI:10.1126/science.1059852.
- [58] MCCRAY B A, SKORDALAKES E, TAYLOR J P. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(6): 1033-1047. DOI:10.1093/hmg/ddp567.
- [59] BAO L L, DENG W, HUANG B Y, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice[J]. *Nature*, 2020, 583(7818):830-833. DOI:10.1038/s41586-020-2312-y.
- [60] CHOUDHARY S K, ARCHIN N M, CHEEMA M, et al. Latent HIV-1 infection of resting CD4⁺ T cells in the humanized Rag2^{-/-} γ c^{-/-} mouse[J]. *J Virol*, 2012, 86(1): 114-120. DOI: 10.1128/jvi.05590-11.

- [61] MOTA J, RICO-HESSE R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype[J]. J Virol, 2009, 83(17):8638-8645. DOI:10.1128/JVI.00581-09.
- [62] JIMÉNEZ-DÍAZ M B, MULET T, VIERA S, et al. Improved murine model of malaria using plasmodium falciparum competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2R gamma null mice engrafted with human erythrocytes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10):4533-4536. DOI: 10.1128/AAC.00519-09.
- [63] WASHBURN M L, BILITY M T, ZHANG L G, et al. A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease[J]. Gastroenterology, 2011, 140(4): 1334-1344. DOI:10.1053/j.gastro.2011.01.001.
- [64] WAHL A, DE C, FERNANDEZ M A, et al. Precision mouse models with expanded tropism for human pathogens[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(10): 1163-1173. DOI: 10.1038/s41587-019-0225-9.
- [65] SUN J, LI N, OH K S, et al. Comprehensive RNAi-based screening of human and mouse TLR pathways identifies species-specific preferences in signaling protein use[J]. Sci Signal, 2016, 9(409): ra3. DOI:10.1126/scisignal.aab2191.
- [66] YUE F, CHENG Y, BRESCHI A, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome[J]. Nature, 2014, 515(7527):355-364. DOI:10.1038/nature13992.
- [67] CHEN Q F, KHOURY M, CHEN J Z. Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(51): 21783-21788. DOI: 10.1073/pnas.0912274106.
- [68] CHAPPAZ S, FINKE D. The IL-7 signaling pathway regulates lymph node development independent of peripheral lymphocytes[J]. J Immunol, 2010, 184(7): 3562-3569. DOI: 10.4049/jimmunol.0901647.
- [69] LI Y, MASSE-RANSON G, GARCIA Z, et al. A human immune system mouse model with robust lymph node development [J]. Nat Methods, 2018, 15(8):623-630. DOI:10.1038/s41592-018-0071-6.
- [70] FISCHBACH M A. Microbiome: focus on causation and mechanism[J]. Cell, 2018, 174(4): 785-790. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.038.
- [71] MIURA H, QUADROS R M, GURUMURTHY C B, et al. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors[J]. Nat Protoc, 2018, 13(1):195-215. DOI:10.1038/nprot.2017.153.
- [72] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. Nature, 2019, 576(7785):149-157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- [73] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. Nature, 2016, 533(7603): 420-424. DOI:10.1038/nature17946.
- [74] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. Nature, 2017, 551(7681): 464-471. DOI: 10.1038/nature24644.
- [75] SCHUTGENS F, CLEVERS H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases[J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 211-234. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611.
- (收稿日期: 2021-11-15 修回日期: 2022-01-26)
(本文编辑: 张俊彦)

《实验动物与比较医学》2022年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管,上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办,是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被美国“Chemical Abstracts”、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录,2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究,以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理,以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊,大16开,铜版纸,彩色印刷;全年出版6期,每期定价30元/本,全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅,邮发代号为4-789;也可以联系本刊编辑部购买,联系电话:021-50793657。E-mail:bjb50793657@163.com。编辑部地址:上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部