



范昌发, 博士, 研究员, 博士生导师, 中国食品药品检定研究院模式动物研究室主任, 组建了该院的遗传修饰动物模型制作平台, 构建了全球首个人源化新冠小鼠模型 hACE2-KI, 自主建立了致癌模型 KI.C57-ras V2.0 等代表性小鼠模型, 并广泛用于我国新冠疫苗研发及新药临床前致癌性评价。发表论文 100 余篇, 包括 *Science* (2 篇)、*Nature*、*Cell Host & Microbe*、*STTT* (3 篇)、*NSR*、*EMI* (3 篇)、*Cancer Science*、*Cell Research*、*Virus* (2 篇)、*Vaccine* (4 篇) 等杂志; 获得 Cell Press 杂志社评选的“2020 年度中国区最受欢迎论文”; 申请专利 13 项, 授权 10 项; 承担或组织申请国家自然科学基金、国家重大新药创制专项、国家传染病重大专项、国家病原学专项课题等 17 项; 荣获中国药学会科学技术奖二等奖 1 项, 北京市科学技术进步奖一等奖 1 项、二等奖 1 项。自主研制遗传修饰大、小鼠模型 50 余种。

研究工作被英国 *The Economist*、美国 Cell Press、中国科学网、北京科技报等媒体专题报道。被科技部评选为“全国科技系统抗击新冠肺炎疫情先进个人”。

刘甦苏, 毕业于中国农业大学, 动物医学专业硕士, 副主任技师, 现工作于中国食品药品检定研究院, 一直从事与药品检定和安全评价相关的遗传修饰模式动物技术工作, 涉及医药学术领域中的肿瘤类动物模型、传染病动物模型、人源化动物模型三大类研究范围。工作期间主持、参与国家级及院级课题共 6 项, 发表期刊论文共 29 篇, 其中第一作者 7 篇 (SCI 论文 1 篇, 核心期刊论文 6 篇); 合编专著 1 部; 专利申请/授权共 10 项, 其中专利授权 4 项, 新申请专利 6 项; 起草并发布中国实验动物学会团体标准 2 项。获北京实验动物行业协会科学技术二等奖、2020 年北京实验动物行业协会先进个人称号。



$hKDR^{+/+}$ 人源化及 $Rag1^{-/-}$ 基因缺陷新型双靶点遗传修饰荷瘤小鼠模型的建立

刘甦苏, 吴 勇, 曹 愿, 赵皓阳, 翟世杰, 孙晓炜, 李琳丽, 范昌发

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家啮齿类实验动物资源库, 北京 102629)

[摘要] **目的** 通过增强血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 人源化小鼠 ($hKDR^{+/+}$) 接纳不同来源的小鼠肿瘤细胞系的潜力, 建立能支持多种肿瘤细胞系成瘤的、可评价针对 VEGFR 靶点药物的新型荷瘤小鼠模型。**方法** 首先建立基于 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型评价针对 VEGFR 靶点抗体体内活性的方法, 同时采用 CRISPR/Cas9 技术构建重组激活基因 1 (recombination activating gene 1, $Rag1$) 敲除的 C57BL/6N 小鼠 (命名为 $Rag1^{-/-}$ 小鼠)。然后将 $Rag1^{-/-}$ 小鼠与 $hKDR^{+/+}$ 小鼠交配, 筛选获得双基因纯合、双靶点基因修饰的 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠。最后在 $hKDR^{+/+}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 C57BL/6N 小鼠上测试不同小鼠品系来源肿瘤细胞系的体内肿瘤生长差异。**结果** 针对 VEGFR 靶点设计的抗体在 $hKDR^{+/+}$ 小鼠体内表现出明显的抗肿瘤活性, 与 PBS 组相比, 肿瘤体积明显减小 ($P<0.01$), 肿瘤质量明显减轻 ($P<0.05$)。 $Rag1^{-/-}$ 小鼠、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠的外周血 B 细胞和 T 细胞数量均明显减少 ($P<0.05$, $P<0.001$)。 C57BL/6 小鼠来源的 MC38 细胞接种 7 d 后, 在 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、C57BL/6N 和 $hKDR^{+/+}$ 四组小鼠体内均可见肿瘤生长。 BALB/c 小鼠来源的 CT26 细胞接种 10 d 后, 仅在 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠体内见到肿瘤生长, 在 C57BL/6N 及 $hKDR^{+/+}$ 小鼠中均未见肿瘤生长; 接种后 3 周, $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠的成瘤体积明显大于 $Rag1^{-/-}$ 小鼠 ($P<0.01$)。**结论** 获得了 $Rag1$ 基因敲除小鼠, 并进一步筛选获得新型 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 双靶点基因修饰小鼠模型; $Rag1$ 基因缺失时, 不同品系小鼠来源的肿瘤细胞系更易成瘤。这提示可以通过降低 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠的免疫反应能力, 增强或扩大该模型小鼠接纳肿瘤细胞系的范围, 构建多种可用于评价 VEGFR 靶点药物的荷瘤小鼠模型。

[关键词] $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠; $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠; VEGFR 靶点; 抗体; 肿瘤

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)02-0103-09



[基金项目] 国家科技重大专项课题“创新生物技术药评价及标准化关键技术研究”(2018ZX09101-001)

[第一作者] 刘甦苏(1981—), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事模式动物研究。E-mail: liususu@nifdc.org.cn

[通信作者] 范昌发(1970—), 男, 研究员, 主要从事模式动物研究。E-mail: fancf@nifdc.org.cn。ORCID: 0000-0001-5556-2025

Establishment of $hKDR^{+/+}$ Humanized and $Rag1^{-/-}$ Gene Knockout Double Genetically Modified Mouse Model

LIU Susu, WU Yong, CAO Yuan, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie, SUN Xiaowei, LI Linli, FAN Changfa

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control; National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Beijing 102629, China)

Correspondence to: FAN Changfa (ORCID: 0000-0001-5556-2025), E-mail: fancf@nifdc.org.cn

[ABSTRACT] Objective Through improving the potential of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-humanized mouse model ($hKDR^{+/+}$) with C57BL/6N background to allow the growth of different mouse tumor cell lines, to establish novel tumor-bearing mouse models which can support *in vivo* tumorigenesis of different mouse tumor cell lines and be used to evaluate drugs targeting VEGFR. **Methods** Firstly, a method to evaluate the *in vivo* activity of antibody targeting VEGFR based on the $hKDR^{+/+}$ humanized mouse model was established. Recombinant activating gene 1 ($Rag1$) knockout mice ($Rag1^{-/-}$) were established using CRISPR/Cas9 technology. Then these $Rag1^{-/-}$ mice were crossed with $hKDR^{+/+}$ mice to get a double gene modified homozygous $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ mouse model by screening. Finally, tumor cell lines derived from different mouse strains were tested on the double gene-modified mouse model to compare the differences in tumor growth. **Results** Antibodies designed for VEGFR showed significant anti-tumor activity in $hKDR^{+/+}$ mice, which significantly reduced tumor volume and weight compared with the PBS group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The number of B cells and T cells in the peripheral blood of $Rag1^{-/-}$ mice and $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ mice decreased ($P < 0.05$, $P < 0.001$). Tumors were observed in $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$, $Rag1^{-/-}$, wild-type, and $hKDR^{+/+}$ mice after 7 d of inoculation of MC38 cells derived from C57BL/6 mice. Tumors were only observed in groups of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ and $Rag1^{-/-}$ mice, but not in the wild-type and $hKDR^{+/+}$ mice after 10 d of inoculation with CT26 cells derived from BALB/c mice. After 3 weeks of inoculation, the tumor volume of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ mice was significantly larger than that of $Rag1^{-/-}$ mice ($P < 0.01$). **Conclusion** $Rag1$ knockout mice were obtained and a novel $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ double genes modified mouse model was further screened. The tumor cell lines from different mouse strain origins were more prone to growth in mice with $Rag1$ gene deficiency. The results suggest that the reduced immune response of $hKDR^{+/+}$ humanized mice will improve the capacity of supporting the growth of mouse tumor lines in the model. As a result, more tumor-bearing mouse models may be constructed for the evaluation of drugs targeting VEGFR in this way.

[Key words] $hKDR^{+/+}$ humanized mice; $Rag1^{-/-}$ knockout mice; VEGFR target; Antibodies; Tumor

肿瘤血管生成与肿瘤生长、侵入和转移关系密切,因此抗血管生成是治疗肿瘤的重要策略之一。其中,以血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体家族(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR, 即KDR)为靶点的抗肿瘤治疗越来越受到研究人员的重视。目前,作用于VEGF/VEGFR通路的抗肿瘤药物主要有两类:一类是单克隆抗体,另一类是小分子VEGFR酪氨酸激酶抑制剂。这两类药物均已在我国临床中应用。针对VEGFR靶点的抗体药物如雷莫芦单抗(ramucirumab, 商品名: Cyramza)作为一种全人源、靶向VEGFR的IgG1型单克隆抗体,是目前唯一上市的VEGFR靶点抗体药物。小鼠VEGFR(mKDR)与人VEGFR(hKDR)存

在不同的关键氨基酸,导致二者功能差异较大。研究人员针对基因研发的抗体不能与基因结合,而且在评价相关抗体时缺少合适的小鼠模型。因此,建立人源化小鼠模型有助于该靶点抗体药物的研发及其体内效力和安全性的评价^[1-3]。

常见的免疫缺陷小鼠有NOD scidy^[4]、NOD Ragy^[5]、NSG MHC I -null^[6]、 $Rag1$ 、 $Rag2$ 等,这些小鼠不能产生功能性T、B淋巴细胞或自然杀伤(natural killer, NK)细胞^[7-8],因而可以作为移植瘤模型的载体^[4,9],很好地支持非鼠源性肿瘤细胞成瘤,建立荷瘤小鼠模型。 $Rag1$ 基因编码重组激活(recombinase activating gene, Rag)复合物的催化成分,其突变或缺失会使其编码的重组酶活性完全或部分丧失,使T、B淋巴细胞

的早期发育被阻断,导致原发性免疫缺陷病^[8]。故 *Rag1* 基因敲除小鼠常被用于疾病小鼠模型,以损害T细胞和B细胞的发育来减弱免疫排斥。

本实验室前期已建立 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠模型,证实其能有效地评价人 VEGFR 抗体的体内效力及安全性。该小鼠模型全称为 C57BL/6-KDR^{em1 (hKDR)}/NIFDC,简称 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠。该模型采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将 *hKDR* 基因的蛋白质编码区的部分外显子 4~7, 插入到 *mkdr* 基因的外显子 4 处构建获得^[10]。该模型免疫系统正常,能很好地支持同背景来源的鼠源性肿瘤细胞的生长成瘤,但存在不同背景来源的鼠源性肿瘤细胞系和人源肿瘤细胞相互排斥的问题,不易建成多类型的成瘤鼠模型。为解决这个问题,本研究首先测试了 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠评价针对 VEGFR 靶点抗体体内活性的能力,同时采用 CRISPR/Cas 9 技术敲除 C57BL/6N 小鼠的 *Rag1* 基因,获得 T、B 淋巴细胞降低的免疫缺陷 *Rag1*^{-/-} 小鼠模型;随后将 *Rag1*^{-/-} 小鼠与 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠杂交,筛选获得双靶点遗传修饰小鼠,该小鼠模型全称为 C57BL/6-Rag1^{em1}/KDR^{em1 (hKDR)}/NIFDC,简称 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠。本研究的目的是在 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠模型的基础上,同时降低其对不同品系小鼠来源细胞的排斥,提高不同背景肿瘤细胞的接种成功率,为开展多种抗肿瘤抗体治疗研究提供合适的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6N 和 ICR 小鼠来自中国食品药品检定研究院实验动物研究所 [SCXK (京) 2022-0002], 繁育环境为屏障设施。动物接种及观察实验在屏障设施环境 [SYXK (京) 2022-0014] 中进行,饲喂灭菌小鼠颗粒饲料,饮用灭菌自来水。在清洁级环境下进行动物取材。本实验所有研究均按照中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理委员会批准的动物方案进行,审查编号为中检动(福)第 2021 (B) 002 号。

1.2 结肠癌细胞株

鼠源结肠癌细胞 MC38 和 CT26 由北京神州细胞生物技术有限公司赠送。其中,MC38 细胞来自 C57BL/6 小鼠结肠腺癌细胞系,购自上海慧颖生物科技有限公司(货号 M023),CT26 细胞来自 BALB/c 小鼠结肠腺癌细胞系,购自美国标准培养物保藏中心(American

Type Culture Collection, ATCC) (编号 CRL-2638),均传代 6~8 代。

1.3 主要仪器及试剂

480 II 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司; Nano Drop 超微量分光光度计购自美国 Thermo 公司; Cas9 转录试剂盒 (AM1344), Poly (A) 加尾试剂盒 (AM1350), MEGAshortscript T7 sgRNA 转录试剂盒 (AM1354), MEGAclear 转录清除回收试剂盒 (AM1908) 均购自美国 Life Technologies 公司,质粒提取试剂盒 (#12362) 和 RNeasy Mini 纯化试剂盒 (#74104) 购自中国 Qiagen 公司。细胞培养用培养基 (11960044)、胎牛血清 (10100147)、青链霉素混合液 (15140122)、0.25% 的胰蛋白酶 (25200072) 均购自美国 Gibco 公司; 细胞流式细胞术所用试剂均购自美国 BioLegend 公司。抗体药物 Ramucirumab 购自美国 Eli Lilly 公司, VEGFR2-HK19 由北京义翘神州科技股份有限公司赠送。本研究中所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。舒泰 50 购自法国 Virbac 公司 [批准文号: (2020) 外兽药证字 06 号], 盐酸赛拉唑购自长沙拜特生物科技有限责任公司 (批准文号: 兽药字 180121777)

1.4 用 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠评价抗体的体内抗肿瘤活性

hKDR^{+/+} 人源化小鼠模型的构建步骤详见文献^[10]。选用 3 周龄雄性 *hKDR*^{+/+} 小鼠,将鼠结肠癌 MC38 细胞 (5×10^6 细胞/只) 皮下接种到小鼠背侧。每天监测小鼠的一般健康状况,每周测量 2 次体质量,并使用游标卡尺测量肿瘤长径 (*a*) 和短径 (*b*), 计算肿瘤体积 $V = (a \times b^2) / 2$ 。当肿瘤体积达到 100~200 mm³ 时,将荷瘤小鼠随机分为不同组(每组 4 只),每周两次给予 Ramucirumab、VEGFR2-HK19 或同等体积的 PBS 溶剂,每只小鼠给药剂量为 20 mg/kg,共治疗 3 周。给药后,每 5 d 测量 1 次肿瘤体积,每周测量 1 次小鼠体质量。实验结束时,采用 CO₂ 吸入法对实验动物实施安乐死后解剖小鼠,收集肿瘤组织,称重。

1.5 构建 *Rag1*^{-/-} 免疫缺陷小鼠模型

通过 NCBI 查询 *Rag1* 鼠源基因, *Rag1* 基因位于 2 号染色体,全长 11 kb (Gene ID: 19373), 利用 crispr.mit.edu 网站在 *Rag1* 基因的第二外显子内设计一对互补的敲除引物,并构建 sgRNA 表达载体。随后使用质粒提取试剂盒提取构建好的 sgRNA 表达载体,并使用引

物 Rag1-pT7-sgRNA-F、Rag1-pT7-sgRNA-R (序列见表1), 以sgRNA质粒为模板进行PCR扩增。在37℃条件下用MEGAscript T7转录试剂盒进行体外转录, 并使用MEGAclear转录清洁回收试剂盒进行纯化。超数排卵C57BL/6N小鼠、显微注射并胚胎移植到ICR小鼠后, 筛选获得Rag1杂合敲除小鼠模型。随后进一步通过交配筛选Rag1纯合敲除小鼠模型, 并留种建系。为进一步验证基因敲除的正确性, 随机取Rag1纯合基因敲除小鼠与野生型小鼠, 针对Rag1基因的编码序列设计引物, 上游引物为Rag1-F, 下游引物为Rag1-R (序列见表1), 扩增目的片段为351 bp, 通过基因扩增测序后进行序列验证和比对, 随后进一步采用外周血淋巴细胞流式细胞术进行表达验证。

表1 模型建立所需引物信息

Table 1 Primers for model development

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
Rag1-T7 sgRNA-F	TAGGTGAAACGATTCCCACAGATG
Rag1-T7 sgRNA-R	AAACCATCTGTGGGAATCGTTTCA
Rag1-F	GGGGAAACCTTACCTAGAACAG
Rag1-R	AGAATTCCGTCGGGTGGAT
KDR-F	TTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAG
KDR-R	CCAGCACTGTCTAAATTCAACGGC
KDR-WF	GTATGTGTTTCTCTGCCCTCCTCG

1.6 构建 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源化免疫缺陷双靶点小鼠模型

构建的 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠和纯合 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠, 分别饲养于屏障设施, 选取6~8周龄的小鼠交配。剪鼠尾提取DNA, 用PCR鉴定其基因型, 选出双基因阳性的小鼠定为F1代并同胞兄妹交配。依次类推, 经过5代交配后得到双基因纯合的遗传修饰小鼠。

选取出生3~7 d的 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 纯合人源化免疫缺陷小鼠6只, 采用PCR方法鉴定基因型。剪取尾部0.5 cm左右组织, 提取基因组DNA, PCR扩增筛选, 引物见表1, 分别命名为Rag1-F、Rag1-R、KDR-F、KDR-R和KDR-WF。

1.7 外周血淋巴细胞流式细胞术检测

使用舒泰和赛拉嗪麻醉各实验分组的3只小鼠后, 眼内眦采血, 血样加入等体积的0.9% NaCl稀释; 平铺至淋巴细胞分离液面上, 离心取分离液层, 去除红细胞后, PBS洗涤2次。将小鼠外周血淋巴细胞重悬于染

色缓冲液中, 分别加入抗CD3 (PE标记) 和抗CD19 (APC标记) 的荧光抗体进行标记, 冰上避光孵育20 min, 染色缓冲液洗涤2次后, 按流式细胞常规方法检测T细胞 (CD3标志) 和B细胞 (CD19标志) 含量并分析细胞比例。采用CellQuest软件分析样品, 每个样品收集 1×10^4 个细胞检测淋巴细胞数量, 结果以淋巴细胞百分含量散点图表示。

1.8 培养肿瘤接种细胞

鼠源结肠癌CT26和MC38细胞用含10% FBS和1% PS的DMEM培养基, 在37℃、5% CO₂的培养箱中培养, 待细胞铺满80%左右, 使用胰蛋白酶消化细胞, 离心收获并传代培养, 至一定数量后收集, 将收集到的细胞用锥虫蓝进行染色并计数。

1.9 建立双靶点遗传修饰的荷瘤小鼠模型

选用 $hKDR^{+/+}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和C57BL/6N共4种不同小鼠, 每组各5只, 用于建立荷瘤小鼠模型。收集对数生长期的CT26和MC38细胞, 使用无血清的DMEM培养液重悬细胞, 并将细胞浓度调整为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 后, 各取100 μL 分别接种于小鼠左右肢根部皮下。接种当日记为第0日, 每日观察接种部位肿瘤生长情况, 并称量小鼠体重; 待观察到肿瘤生长, 每周2次用游标卡尺测量肿瘤长径 (a) 和短径 (b), 按照肿瘤体积 $V = (a \times b^2) / 2$ 计算肿瘤体积。当小鼠体重质量下降超过25%~30%或肿瘤体积超过3 000 mm³, 提示小鼠生存质量受到严重影响, 这时即停止测量, 并采用CO₂吸入法对实验动物实施安乐死。测定时间是4周。

1.10 数据统计分析

用GraphPad Prism 8.0软件对结果数据进行统计分析并制图方差齐性分析后, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据分析采用两因素方差分析, 组内两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

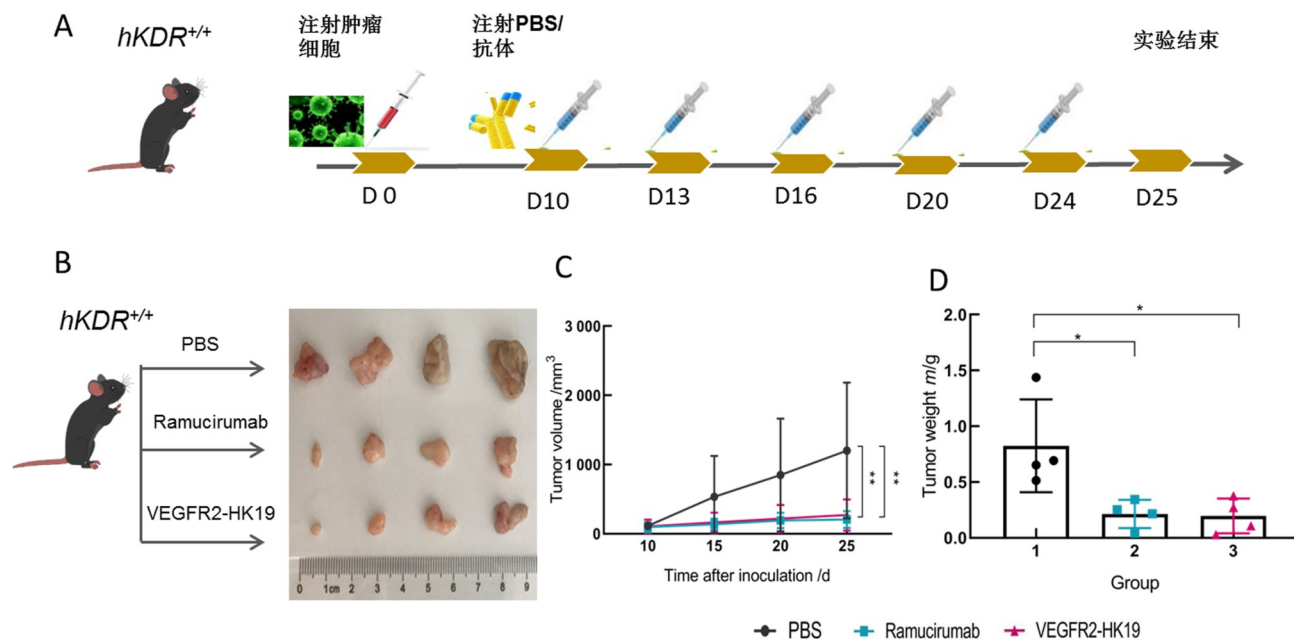
2 结果

2.1 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型能很好地评价 VEGFR2靶点抗体的抗肿瘤活性

为了验证 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型, 评价针对VEGFR靶点设计的抗体药物的抗肿瘤活性, 本研究首先通过皮下注射MC38细胞建立了 $hKDR^{+/+}$ 荷瘤模型。如图1A所示, 携带MC38衍生肿瘤的 $hKDR^{+/+}$ 小鼠接受Ramucirumab和VEGFR2-HK19这两种针对VEGFR靶

点的单克隆抗体治疗。其中,单抗 Ramucirumab 抗体已经 FDA 批准上市。实验全程,测量肿瘤体积。结果表明,与 PBS 对照组相比,经 Ramucirumab 和 VEGFR2-HK19 治疗后 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤外观见图 1B; 统计分析显示治疗组肿瘤体积 (图 1C) 明显减小

($P<0.01$), 肿瘤质量 (图 1D) 明显减轻 ($P<0.05$)。相比之下, PBS 组不会导致 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤形状、肿瘤体积或质量改变。这些结果表明,抗体能有效抑制 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤生长, $hKDR^{+/+}$ 小鼠能很好地评价针对 VEGFR 靶点抗体的体内抗肿瘤活性。



注: A 为用人源化抗体或 PBS 治疗 MC38 荷瘤 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的实验方案示意图 (D0、D10、D13、D16、D20、D24 和 D25 分别表示注射肿瘤细胞当天及之后的第 10、13、16、20、24、25 天); B 为在治疗结束时, 对每只小鼠的肿瘤进行解剖, 并确定肿瘤大小; C 为 Ramucirumab 和 VEGFR-HK19 抗体能显著降低肿瘤体积 (每组 4 只小鼠, $^{**}P<0.01$); D 为治疗结束时, 各组肿瘤质量的比较 (每组 4 只小鼠, $^{*}P<0.05$)。

Note: A shows the experimental flow diagram of treating MC38 tumor bearing $hKDR^{+/+}$ mice with humanized antibody or PBS (D0, D10, D13, D16, D20, D24 和 D25 show the day of injection and the 10th, 13th, 16th, 20th, 24th 和 25th day after the injection of tumor cells, respectively); B shows the tumors were dissected from each mouse in different groups at the end of the treatment period; C shows Ramucirumab and VEGFR-HK19 can significantly reduce tumor volume ($n=4$, $^{**}P<0.01$); D shows the tumor weight in different groups at the end of the treatment ($n=4$, $^{*}P<0.05$).

图1 针对 VEGFR2 靶点的抗体能抑制 $hKDR^{+/+}$ 小鼠的肿瘤生长

Figure 1 Antibody targeting VEGFR2 targets can inhibit tumor growth in $hKDR^{+/+}$ mouse

2.2 成功构建 $Rag1^{-/-}$ 免疫缺陷小鼠模型

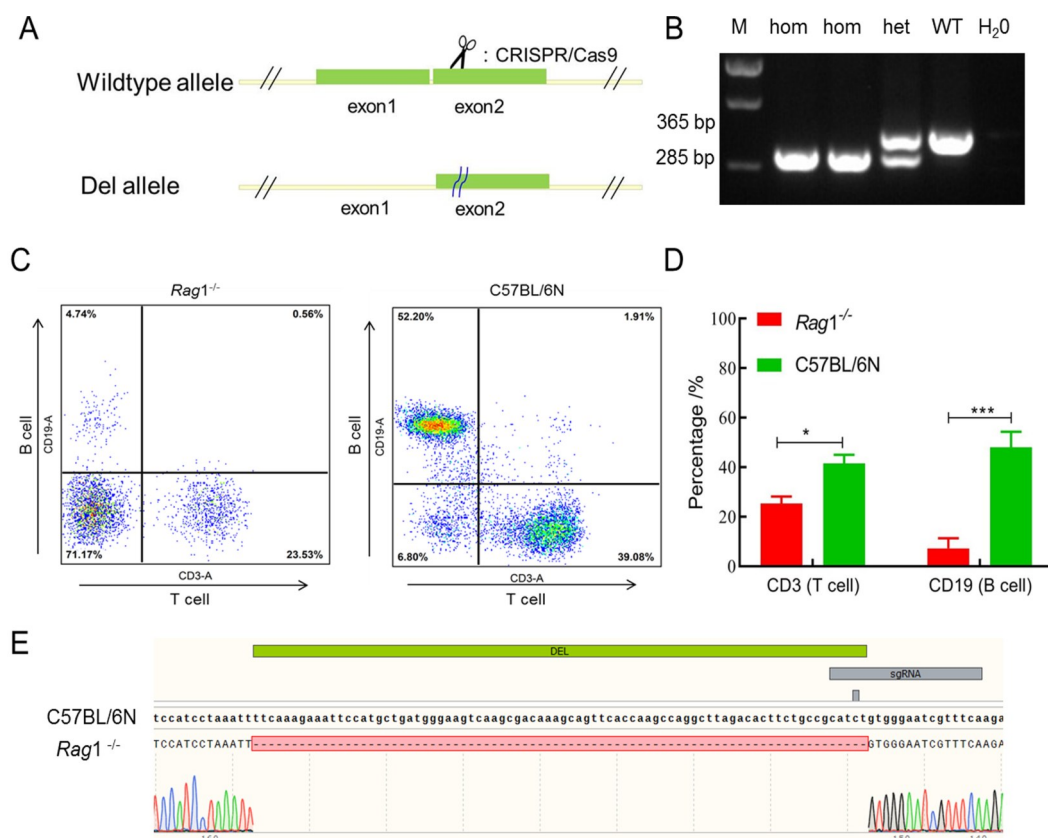
根据模型构建示意图 (图 2A), 设计并合成 sgRNA 后, 将活性最高的 sgRNA 插入到带 T7 启动子质粒载体 pT7-sgRNA 上并进行体外转录, 随后将 sgRNA 及 Cas9 mRNA 注射受精卵并移植至 ICR 假孕鼠。共注射并移植受精卵 196 枚, 出生小鼠 18 只, 筛选获得首建鼠 1 只。经过与野生型 C57BL/6N 杂交扩大繁殖后自交, 获得 3 只 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠; PCR 鉴定基因型结果见图 2B, 只扩增出 285 bp 目的条带为纯合小鼠, 扩增出 365 bp 及 285 bp 目的条带为杂合小鼠。

针对 $Rag1$ 基因双向 DNA 测序比对, 结果证明

$Rag1$ 基因在 382 到 462 位点缺失 80 bp (图 2E), 片段缺失位点在 sgRNA 设计位点的前端。进一步扩繁后, 取 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除小鼠的眼眶血, 流式细胞术检测外周血中 T 细胞和 B 细胞含量。结果显示, $Rag1^{-/-}$ 小鼠的 T 细胞 (CD3 标志) 和 B 细胞 (CD19 标志) 含量较 C57BL/6N 小鼠的明显降低 ($P<0.05$, $P<0.001$, 图 2C~D), 说明 $Rag1^{-/-}$ 免疫缺陷小鼠模型建立成功。

2.3 成功交配获得 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源化免疫缺陷小鼠

在验证 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠能很好地评价针对



注：A为模型的构建设计图示；B为 *Rag1* 基因敲除 (*Rag1*^{-/-}) 小鼠的基因型鉴定图 (hom, 基因纯合小鼠; het, 基因杂合小鼠; WT, 野生型小鼠); C为 *Rag1*^{-/-} 基因小鼠和 C57BL/6N 野生型小鼠外周血 T、B 淋巴细胞百分含量散点图; D为 2 组小鼠 T、B 淋巴细胞百分含量分析柱状图 (每组 3 只小鼠, *P<0.05, ***P<0.001); E 为 *Rag1* 基因目的片段测序及序列对比, 其中 DEL 表示敲除的片段。

Note: A shows model construction design; B shows genotype identification map of *Rag1*^{-/-} mice (hom shows homozygous mice; het shows heterozygous mice; WT shows wild-type mice). C shows scatter diagrams of the percentage of T and B lymphocytes in peripheral blood of *Rag1*^{-/-} mice and C57BL/6N wild-type mice. D shows the bar chart of percentage analysis of T and B lymphocytes in the two groups of mice (n=3, *P<0.05, ***P<0.001). E shows the sequence comparison of target fragments of the *Rag1* gene. DEL shows the knockout segment.

图2 *Rag1*^{-/-} 基因敲除小鼠的构建及验证

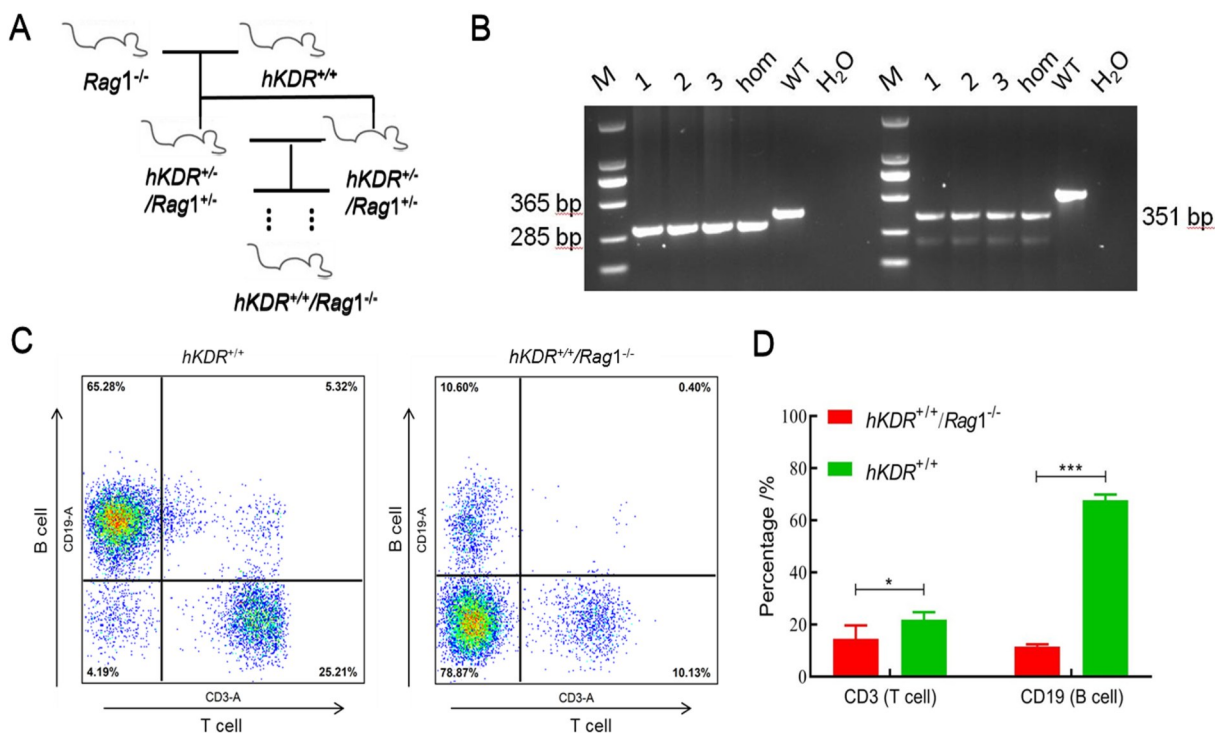
Figure 2 Design strategy and validation of *Rag1*^{-/-} gene knockout mice

VEGFR 抗体的体内抗肿瘤活性基础上, 进一步将雄性 *Rag1*^{-/-} 小鼠与雌性 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠交配, 筛选获得 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 双靶点遗传修饰小鼠, 交配及筛选流程见图 3A。针对插入基因 *hKDR*⁺ 及敲除基因 *Rag1* 设计引物, 进行双靶点小鼠模型的基因型鉴定, *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠目的条带大小为 351 bp, *Rag1*^{-/-} 小鼠目的条带大小为 285 bp, 小鼠正确扩增这 2 种条带则判定为 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠。图 3B 中样本 1、2、3 即为双基因纯合小鼠。

通过流式细胞术检测 *hKDR*^{+/+} 小鼠和 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠外周血中 B 细胞 (CD3 标志) 和 T 细胞 (CD19 标志) 含量, 可见 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 双靶点小鼠中的 T、B 细胞含量较 *hKDR*^{+/+} 人源化小鼠明显降低, 差异有统计学意义 (P<0.05, P<0.001, 图 3C~D)。

2.4 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 人源双靶点基因修饰小鼠利于 CT26 肿瘤细胞生长

观察 CT26 和 MC38 鼠源肿瘤细胞分别接种于 *hKDR*^{+/+}、*Rag1*^{-/-}、*hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 和 C57BL/6N 这 4 种小鼠左右后肢根部皮下的肿瘤生长情况, 结果显示, 右后肢接种 C57BL/6N 小鼠来源的 MC38 细胞后, 4 种小鼠均在 7 d 左右开始有肿瘤生长, 整个实验周期各种小鼠的成瘤体积差异无统计学意义 (图 4A)。左后肢接种 BALB/c 小鼠来源的 CT26 细胞 10 d 后, 仅 *Rag1*^{-/-} 和 *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠观察到肿瘤生长, 而 C57BL/6N 和 *hKDR*^{+/+} 小鼠未见肿瘤生长; 接种后 3 周, *hKDR*^{+/+}/*Rag1*^{-/-} 小鼠的成瘤体积大于 *Rag1*^{-/-} 小鼠, 二者差异有统计学意义 (P<0.01), 具体数据如图 4B~D 所示。从成瘤实验结果可知, 同一只小鼠同时接种 MC38 和



注: A为 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源双靶点基因修饰小鼠繁育流程; B为 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源双靶点基因小鼠基因型鉴定(1、2、3为双基因纯合小鼠, hom指基因纯合小鼠, WT指野生型小鼠); C为 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源双靶点基因修饰小鼠的外周血T、B淋巴细胞百分含量散点图; D为2组小鼠T、B淋巴细胞百分含量分析柱状图(每组3只小鼠, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)。

Note: A shows breeding process of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ humanized double target gene-modified mice; B shows genotype identification of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ humanized double target gene mice (1, 2, 3 show homozygous mice with two genes, hom shows homozygous mice, WT shows wild-type mice); C shows scatter diagrams of percentage of T and B lymphocytes in the peripheral blood of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ humanized double target gene-modified mice; D shows the bar chart of percentage analysis of T and B lymphocytes in the two groups of mice ($n = 3$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

图3 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 双靶点基因修饰小鼠的获得及验证

Figure 3 Design strategy and validation of $hKDR^{+/+}$ humanized and $Rag1^{-/-}$ deficient double genetically modified mouse model

CT26细胞后成瘤情况不一致,提示不同来源背景的肿瘤细胞系只能在免疫缺陷的 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠中有肿瘤生长。

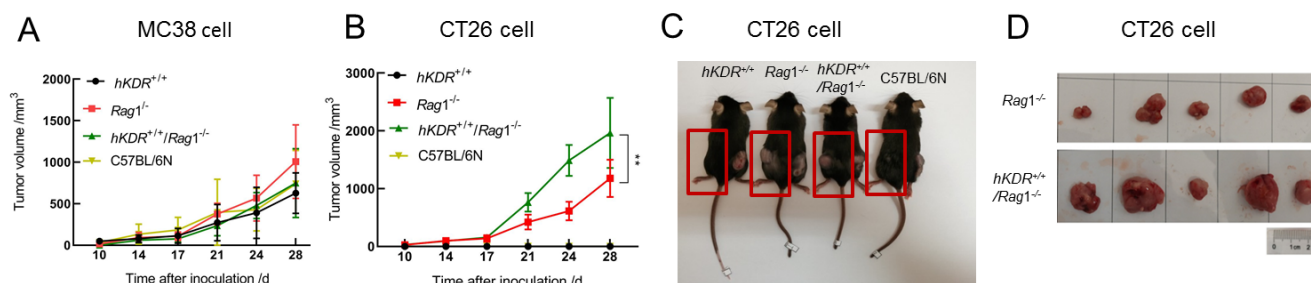
3 讨论

肿瘤的发生、发展与转移受到多种因素的影响,肿瘤微环境中新生血管的形成是多因素相互作用的结果,新生血管在肿瘤的发展转移过程中起到重要作用^[11]。近年来,以 $hKDR$ 基因及其受体为靶点的抗肿瘤治疗受到越来越多的关注,相关人源化小鼠模型在药效评价及其作用机制研究等方面可发挥基础性作用。

本研究团队前期通过CRISPR/Cas9技术已获得了人VEGFR插入的 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型^[10]。本研究中,首先皮下接种C57BL/6来源的MC38细胞并使用靶点VEGFR的抗体药物进行治疗,结果显示抗体药物能

抑制肿瘤生长,证明该模型能很好地评价VEGFR抗体的体内抗肿瘤活性。但前期实验接种BALB/c遗传背景的CT26鼠源细胞后不见肿瘤生长,分析原因可能是小鼠免疫系统对异源肿瘤细胞产生了排斥作用。

因为表型均一、遗传稳定、背景数据充分的优势,模式动物的制作多用C57BL/6品系^[12]。而在开展抗肿瘤研究时往往需要接种不同背景的肿瘤细胞,以获得不同肿瘤类型的荷瘤小鼠模型,用于药效学评价。不同背景的成瘤鼠模型对免疫抑制剂的免疫应答存在差异^[13]。为此,在获得 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠的基础上,本研究通过敲除C57BL/6N小鼠的 $Rag1$ 基因的第二个外显子处前端80 bp片段,导致其编码的重组酶活性部分丧失,使T、B淋巴细胞的早期发育被阻断,导致免疫缺陷,获得 $Rag1^{-/-}$ 小鼠。较已报道的模型而言,本模型采用CRISPR/Cas9技术构建,周期较短,费用较



注：A 为 MC38 鼠源肿瘤细胞移植后的 4 种小鼠肿瘤体积变化比较；B 为 CT26 鼠源肿瘤细胞移植后的 4 种小鼠生长情况；C 为实验末期接种 CT26 细胞（左，红框所示）和 MC38 细胞（右）的成瘤小鼠外观；D 为实验末期接种 CT26 细胞 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠的肿瘤取材。每组 5 只小鼠，** $P < 0.01$ 。

Note: A shows comparison of tumor volume changes in the four types of mice after transplantation of MC38 tumor cells; B shows comparison of tumor volume changes in the four types of mice after transplantation of CT26 tumor cells; C shows the appearances of tumor forming mice inoculated with CT26 cells (left, showed in the red boxes) and MC38 cells (right) at the end of the treatment period; D shows tumor samples of $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ and $Rag1^{-/-}$ mice inoculated with CT26 cells at the end of the experiment. $n=5$, ** $P < 0.01$.

图 4 MC38 和 CT26 肿瘤细胞在 $Rag1^{-/-}$ 基因缺失背景的小鼠模型中正常生长

Figure 4 Tumor growth of MC38 and CT26 cells in mice with $Rag1^{-/-}$ gene deficiency

低。接着将 $hKDR^{+/+}$ 小鼠和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠经杂交筛选，获得 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 人源化免疫缺陷小鼠模型，以期进一步降低宿主小鼠的免疫排斥能力，提高不同背景肿瘤细胞的接种成功率，为相关抗体药物的研发提供更多类型的荷瘤动物模型。

MC38 和 CT26 是常用的小鼠结肠癌细胞株，都属于高转移性小鼠结肠癌细胞，但背景来源不同。其中 CT26 细胞是被 N-亚硝基-N-甲基脲烷诱导得到的未分化的 BALB/c 遗传背景的小鼠结肠癌细胞，MC38 细胞是来自 C57BL/6 小鼠的结肠腺癌细胞系^[14-15]。本实验中，同一只小鼠接种 MC38 和 CT26 细胞后肿瘤生长情况存在差异，MC38 细胞在 $hKDR^{+/+}$ 、 $Rag1^{-/-}$ 、 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 和 C57BL/6N 这 4 种小鼠中均成瘤，但 CT26 细胞仅在 $hKDR^{+/+}/Rag1^{-/-}$ 小鼠和 $Rag1^{-/-}$ 小鼠中正常生长。这些结果表明，降低 T、B 细胞含量能有效增强 $hKDR^{+/+}$ 人源化小鼠模型接受不同背景来源细胞成瘤的潜力。这一结果为下一步的人源肿瘤细胞系或者人源肿瘤组织的移植提供了工作思路^[16-17]。

已有的比较研究已经初步阐明，针对 VEGFR 靶点的抗体是通过诱导细胞凋亡，抑制血管生成，从而表现出抗肿瘤活性，而非依靠宿主免疫反应杀灭肿瘤细胞^[18-20]。这提示本研究建立的 $hKDR^{+/+}$ 人源化及 $Rag1^{-/-}$ 基因敲除的双靶点基因修饰小鼠模型，通过降低自身免疫系统的功能，增强了肿瘤细胞移植的成功率。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理委员会批准[编号：中检动(福)第 2021(B)002 号]。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Experimental Animal Welfare Ethics Committee of National Institutes for Food and Drug Control (Approval Letter No. #2021-B-002). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

刘魁苏和范昌发负责研究方案设计、手稿撰写及修订；吴勇和曹愿负责抗体实验；赵皓阳、翟世杰、孙晓炜和李琳丽负责动物实验和数据收集。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者声明无利益冲突、无署名纠纷。

[参考文献 References]

- OLSSON A K, DIMBERG A, KREUGER J, et al. VEGF receptor signalling—in control of vascular function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5):359-371. DOI:10.1038/nrm1911.
- CHUNG A S, LEE J, FERRARA N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(7):505-514. DOI:10.1038/nrc2868.
- EBOS J M L, KERBEL R S. Antiangiogenic therapy: impact on

- invasion, disease progression, and metastasis[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(4):210-221. DOI:10.1038/nrclinonc.2011.21.
- [4] YAO L C, ARYEE K E, CHENG M S, et al. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1953:241-252. DOI:10.1007/978-1-4939-9145-7_15.
- [5] ITO R, KATANO I, KAWAI K J, et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice [J]. *Transplantation*, 2009, 87(11): 1654-1658. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181a5cb07.
- [6] BREHM M A, KENNEY L L, WILES M V, et al. Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 3137-3151. DOI: 10.1096/fj.201800636R.
- [7] FUGMANN S D, LEE A I, SHOCKETT P E, et al. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 495-527. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.495.
- [8] MOMBAERTS P, IACOMINI J, JOHNSON R S, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes[J]. *Cell*, 1992, 68(5):869-877. DOI:10.1016/0092-8674(92)90030-g.
- [9] BENTZIEN F, STRUMAN I, MARTINI J F, et al. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1 (-/-) mice[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19):7356-7362.
- [10] CAO Y, SUN C Y, HUO G T, et al. Novel hKDR mouse model depicts the antiangiogenesis and apoptosis-promoting effects of neutralizing antibodies targeting vascular endothelial growth factor receptor 2[J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(1):115-128. DOI:10.1111/cas.15594.
- [11] KARAMAN S, LEPPÄNEN V M, ALITALO K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease[J]. *Development*, 2018, 145(14):dev151019. DOI:10.1242/dev.151019.
- [12] CHU V T, WEBER T, GRAF R, et al. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes[J]. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 4. DOI: 10.1186/s12896-016-0234-4.
- [13] 白杰, 高志涛, 石龙, 等. 探讨PD-1抑制剂在不同小鼠肿瘤模型中的应答差异[J]. *解放军医学院学报*, 2019, 40(4):357-363. DOI:10.3969/j.issn.2095-5227.2019.04.013.
- BAI J, GAO Z T, SHI L, et al. Differential PD-1 inhibitor efficacy among different mouse tumor models[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2019, 40(4):357-363. DOI:10.3969/j.issn.2095-5227.2019.04.013.
- [14] TANIURA T, IIDA Y, KOTANI H, et al. Immunogenic chemotherapy in two mouse colon cancer models[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(10):3527-3539. DOI:10.1111/cas.14624.
- [15] 林怡婷, 林雨虹, 阮梅, 等. MC38-luc 稳转细胞株的构建及在小鼠结肠癌肝转移模型中的应用[J]. *福建医科大学学报*, 2018, 52(5):305-310.
- LIN Y T, LIN Y H, RUAN M, et al. Construction and validation of luciferase expressing MC38 cell in murine hepatic metastasis model of colon cancer[J]. *J Fujian Med Univ*, 2018, 52(5):305-310.
- [16] HERBST R S, ARKENAU H T, SANTANA-DAVILA R, et al. Ramucirumab plus pembrolizumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer, gastro-oesophageal cancer, or urothelial carcinomas (JWDF): a multicohort, non-randomised, open-label, phase 1a/b trial [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(8): 1109-1123. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30458-9.
- [17] CHATTERJEE S, HEUKAMP L C, SIOBAL M, et al. Tumor VEGF: VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(4):1732-1740. DOI:10.1172/JCI65385.
- [18] GIATROMANOLAKI A, KOUKOURAKIS M I, SIVRIDIS E, et al. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer[J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(11):878-886. DOI:10.1111/j.1365-2362.2007.01866.x.
- [19] LU R M, CHIU C Y, LIU I J, et al. Novel human Ab against vascular endothelial growth factor receptor 2 shows therapeutic potential for leukemia and prostate cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(12):3773-3787. DOI:10.1111/cas.14208.
- [20] FRANKLIN M C, NAVARRO E C, WANG Y J, et al. The structural basis for the function of two anti-VEGF receptor 2 antibodies[J]. *Structure*, 2011, 19(8): 1097-1107. DOI: 10.1016/j.str.2011.01.019.

(收稿日期:2022-10-09 修回日期:2022-11-27)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,赵宇朋)

[引用本文]

刘甦苏, 吴勇, 曹愿, 等. *hKDR*^{+/+}人源化及 *Rag1*^{-/-}基因缺陷新型双靶点遗传修饰荷瘤小鼠模型的建立[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 103-111. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.154.

LIU S S, WU Y, CAO Y, et al. Establishment of *hKDR*^{+/+} humanized and *Rag1*^{-/-} gene knockout double genetically modified mouse model[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2):103-111. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.154.