



多药耐药基因1(*Abcb1*)敲除和人源化大鼠模型的建立

马婧, 陈炜, 张旭, 马元武, 吕丹, 高虹, 张连峰

(中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 敲除大鼠多药耐药基因1(*Abcb1*), 并在基因敲除大鼠的基础上建立 *Abcb1* 人源化大鼠模型, 为 *Abcb1* 相关药物代谢和药物评价研究提供更接近人类的动物模型。方法 利用大片段转基因技术和 CRISPR/Cas9 技术相结合, 建立人源化大鼠模型, 利用 PCR, RT-PCR 和 Real-time PCR 的方法进行鉴定及分析。结果 将包含人源 *Abcb1* 启动子和 cDNA 的 153 kb BAC 片段转入到大鼠基因组, 获得稳定表达 *h-Abcb1* 基因的大鼠, 同时建立了 *Abcb1* 基因敲除大鼠。通过将两者杂交建立了 *Abcb1* 人源化大鼠模型。人源大鼠与大鼠内源 *Abcb1* 表达谱有明显的区别, 人源化大鼠不仅表达 *h-Abcb1* 基因, 在组织表达谱方面也与人类更接近。结论 建立了 *Abcb1* 基因敲除大鼠和人源化大鼠模型, *Abcb1* 人源化模型可作为 *Abcb1* 基因相关药物代谢研究更接近人类的动物模型。

【关键词】 *Abcb1*; 人源化; BAC; 基因敲除大鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.01

Establishment of *Abcb1* knock out rat and *Abcb1* humanized rat models

MA Jing, CHEN Wei, ZHANG Xu, MA Yuan-wu, LV Dan, GAO Hong, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China,)

【Abstract】 Objective To knock out the *Abcb1* gene of rat, and establish the *Abcb1* humanized rat model based on the *Abcb1* knock out rat. **Methods** The animal model was established using BAC and CRISPR/Cas9 technology, and was analyzed by PCR, RT-PCR and real-time PCR. **Results** Establishing a rat model expressing human *Abcb1* stably by transfer the 153 kb BAC containing human *Abcb1* promoter and cDNA into rat genome, and establishing the *Abcb1* knock out rat at the same time. Establishing the *Abcb1* humanized model by crossing these two strains together. The expression pattern of *Abcb1* in *Abcb1* humanized rat is different from the wild type rat. The *Abcb1* humanized model express not only the human *Abcb1* gene but also has similar expression pattern as human. **Conclusions** The *Abcb1* knock out rat and the *Abcb1* humanized rat were successfully established, and this model is close to human concerning about the drug metabolism related to *Abcb1*.

【Key words】 *Abcb1*; Humanized; BAC; Gene knock out rat

P-糖蛋白是一种相对分子量为 170×10^3 的单链跨膜糖蛋白, 由多药耐药基因 *Abcb1* (又称 *Mdr1*) 编码, 参与药物吸收、分布、代谢及排泄等过程^[1]。

在生理状态下, P-糖蛋白的存在可保护机体安全, 而在病理情况下, P-糖蛋白于血脑屏障的表达使得药物不能进入中枢神经系统^[2], 于肿瘤细胞中的表

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项课题基于人源化模型和肝脏生物功能网络的药物肝毒性预测关键新技术(2012ZX09301001-006)。

【作者简介】 马婧(1991-), 女, 硕士生, 研究方向: 比较医学。E-mail: alanyingtiao519@163.com。

【通讯作者】 张连峰, E-mail: zhanglf@enilas.org; 高虹, E-mail: gaohongdws@aliyun.com。

达^[3]导致机体产生多药耐药现象^[4-5],所以控制 P-糖蛋白表达的 *Abcb1* 基因与多种药物有效性和安全性相关。

大鼠不仅是生理、代谢、神经及行为等研究广泛使用的动物^[6],也是药典规定的用于药物安全性评价的指定动物之一。由于物种差异,大鼠的 P-糖蛋白与人体的 P-糖蛋白的表达图谱和蛋白结构都有一定差异^[7],所以,利用动物进行药物有效性和安全性评价的结果与临床试验结果不一致的情况时有发生^[8]。

采用 BAC^[9](细菌人工染色体)的方法可以将 *h-Abcb1* 基因导入到大鼠的受精卵中,建立基因结构、表达谱和调节方式与人类相似的模型^[10],能够更好的模拟人类 *h-Abcb1* 的表达图谱,从而更加客观的评价药物。同时采取基因敲除的技术^[11-12]剔除大鼠该内源基因的表达,建立人源化大鼠模型,为 *Abcb1* 相关药物筛选、毒理评价提供良好的人源化大鼠模型。

1 材料和方法

1.1 表达 *Abcb1* 的细菌人工染色体及其转基因大鼠的制作

利用同源重组的方法在 *Abcb1*-BAC 克隆(RP11-42N21)距 5' 上游 65 kb 的位置插入 *h-Abcb1* 基因的最长剪接体 cDNA(4718 bp), (构建好的载体起始密码子 ATG 上游长度为 66 kbp, ATG 下游长度为 87 kbp), 构建表达 *Abcb1* 的 BAC 表达载体(中科院动物所提供)。将构建好的载体经过酚氯仿抽提后,调整浓度至 1~2 ng/ μ L, 利用显微注射技术将 BAC 注射到 SD 大鼠的受精卵中(大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】),用 SD 大鼠作为假孕受体大鼠(大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】),制备转基因大鼠(TE2000U 纤维注射仪)。实验相关动物在本所卫生部人类疾病比较医学重点实验室繁育【SYXK(京)2013-002】。实验中设计动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准,批准号为 ILAS-GC-2012-001。

1.2 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的制作

主要包括以下几个部分:1)用于 *Abcb1b* 基因打靶的 gRNA 质粒构建 2)体外转录 3)Cas9/sgRNA 的原核注射。

用于 *Abcb1b* 基因打靶的 gRNA 质粒构建:针对 *Abcb1b* 基因设计两个靶点 GGAGACAAATACA CAAGATT 以及 GG TTTGACGTGAATGACGCT,合成两对寡聚核苷酸链(RAT-ABCB1-E1(1)-gRNA: TAGGAGACAAATACACAAGATT 和 AAACAATCTTG TGTATTTGTCT; RAT-ABCB1-E1(2)-gRNA: TAGGT TTGACGTGAATGACGCT 和 AAACAGCGTCATTCAC GTCAAA)用于制备 sgRNA 合成的寡聚核苷酸经退火(97℃ 6 min 后自然冷却至室温),连入经 *Bsa I* 酶切回收的 pUC57-sgRNA 表达载体(南京大学黄兴许老师惠赠),构建 sgRNA 表达载体。测序验证后,选择正确克隆。

体外转录:Cas9 表达质粒(Addgene No. 44858, 南京大学黄兴许老师惠赠),经 *Age I* 酶切线性化,经酚氯仿抽纯化后,溶于无核酸酶的水中作为模板,用于体外转录。Cas9 mRNA 的合成由试剂盒 T7Ultra Kit(Ambion, AM1345)在体外作用 T7 RNA 聚合酶完成。sgRNA 的表达载体经 *DraI* 酶切线性化后,经酚氯仿纯化,溶于无核酸酶的水中作为模板,用于体外转录。sgRNA 的体外合成由试剂盒 MEGAscript Kit(Ambion, AM1354)在体外利用 T7 RNA 聚合酶完成。

Cas9/sgRNA 的原核注射:转录好的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 混合并且调整浓度至 20 ng/ μ L 和 10 ng/ μ L /sgRNA,显微注射法将 RNA 混合物注射到 SD 大鼠的受精卵的雄性核和细胞质中制备转基因大鼠。

1.3 *Abcb1*-BAC 转基因大鼠及 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的基因型鉴定

首建鼠于出生 7~14 d 时,剪趾标记,收集剪下的组织,选用酚氯仿提取基因组 DNA,溶于 0.1 \times TE 中,使用 PCR 法对首建鼠进行筛选。对于 *Abcb1*-BAC 转基因大鼠,使用三对 PCR 引物分别对插入 BAC 的上中下游进行完整性检测,分别为:*Abcb1*-BAC-F1: 5'-CACCAGTTGAAGAGCGTTGA-3' 下游 *Abcb1*-BAC-R1: 5'-GCTGCTGATGTGCTGATTGT-3' *Abcb1*-BAC-F2: 5'-CCAATGATGCTGCTCAAG-3' 下游 *Abcb1*-BAC-R2: 5'-GAGTTTATGTGCCACCAAGT AG-3' *Abcb1*-BAC-F3: 5'-AGTGCTTTTCAGAATG GC-3' 下游 *Abcb1*-BAC-R3: 5'-GTCAGTTACAGTCC AAATGGG-3' (Life Technologies, 中国)。PCR 反应体系 20 μ L (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程有 限公司,中国)。反应条件:95℃ 5 min; (95℃ 30 s,

58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环); 72℃ 10 min; 4℃ 保温。扩增片段大小分别为 316 bp, 449 bp, 410 bp。对于 *Abcb1b* 基因敲除大鼠, 设计一对引物包含作用靶点, 上游引物为 *Abcb1-check-F1*: GCTACAATGACATGTCCTACCCAAT 下游引物为 *Abcb1-check-R1*: AGTCTTGATTCTGCCAGCCTAGTC (上海英俊生物技术技术有限公司合成, 中国)。PCR 反应体系 50 μL (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程(中国)有限公司, 中国)。反应条件: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s) × 30 循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。扩增片段大小为 737 bp。并通过 TA 克隆、测序进一步检测确定突变。

1.4 *Abcb1* 人源化大鼠的培育

通过将得到的 *rAbcb1b* 基因敲除大鼠进行杂交, 获得 *rAbcb1b* 基因敲除纯合子大鼠, 将 *hAbcb1-BAC* 阳性大鼠与 *rAbcb1b* 基因敲除大鼠杂交, 得到 BAC 阳性且 *rAbcb1b* 基因敲除杂合子大鼠, 将此大鼠与 *rAbcb1b* 基因敲除纯合子大鼠杂交, 即可获得 *hAbcb1-BAC* 阳性且 *rAbcb1b* 基因敲除纯合子大鼠。这种大鼠缺乏 *rAbcb1b* 基因的表达, 同时携带通过 BAC 技术得到的 *hAbcb1* 基因。

1.5 RT-PCR 检测 *hAbcb1* 组织表达情况

Abcb1 人源化大鼠与野生型大鼠交配, 对其子代的基因表达情况进行分析。颈椎脱臼法牺牲大鼠, 提取 F1 代大鼠及野生对照大鼠心脏、肝脏、肾脏、肺、脑组织的总 RNA。制备 cDNA, 利用引物 RT-*Abcb1-F*: 5'-GGCTATCATTACTCTTTACCTGTGAAG-3' 和 RT-*Abcb1-R*: 5'-CCGGATTGACTGAATGCTG-3', 扩增大小为 225 bp 的目的片段, PCR 反应体系 20 μL (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程(中国)有限公司, 中国)。反应条件: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 24 个循环); 72℃ 10 min; 4℃ 保存。GAPDH 作为内参。

1.6 Real-time PCR 检测组织内 *Abcb1*mRNA 表达情况

颈椎脱臼法牺牲大鼠, 提取心、肝、脾、肾、脑、胸腺等组织总 RNA, 制备 cDNA。

标准曲线的建立: 使用引物 *Abcb1-wt-standard-F1*: 5'-CAGGAGATAGGCTGGTTTGACG-3'; *Abcb1-wt-standard-R1*: 5'-GGCCCTTCAAGATCTTAACCTTCA C-3' 以及 *Abcb1-human-standard-F1*: 5'-CAGTGG AATTGGTCTGG-3'; *Abcb1-human-standard-R1*: 5'-AACACTAAAAGCCCCAATTAATACAG-3' 分别扩增

野生型大鼠体内的 *rAbcb1b* 基因以及人源化大鼠体内的 *hAbcb1* 基因, 片段长度分别为 766 bp 及 682 bp。将携带有 *rAbcb1* 基因及 *hAbcb1* 基因的质粒作为模板, 稀释范围为 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^3$ 拷贝/μL, 使用 Power SYBR Green Master Mix 体系, 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min 进入循环: 95℃ 30 s, 59℃ (*rAbcb1*) 或 61℃ (*hAbcb1*) 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 40 次, 在每个循环结束后测定吸光值。建立标准曲线时使用的引物为 *Abcb1-wt-F1*: 5'-GAATGTTCTTTTCAGTCCATAACGA-3' 和 *Abcb1-wt-R1*: 5'-GTTCTGATGGCTGCTAAGACTTC-3' 以及 *Abcb1-human-F1*: 5'-TGTTGCTGCTTACATTCAGG-3' 和 *Abcb1-human-R1* 5'-CAGCTGACAGTCCAAG AACAGG-3'。

使用 *Abcb1-wt-F1/R1* 和 *Abcb1-human-F1/R1* 分别对野生型大鼠及人源化大鼠的 *Abcb1* 基因进行扩增, 根据标准曲线, 计算不同组织拷贝数, 重复 3 次。GraphPad Prism 5 软件分析。

2 结果

2.1 *hAbcb1* - BAC 转基因大鼠的制备与分析

利用同源重组的方法在 *Abcb1-BAC* 克隆 (RP11-42N21) 5' 上游 65 kb 的位置插入 *hAbcb1* 基因的最长剪接体 cDNA (4718 bp), (构建好的载体起始密码子 ATG 上游长度为 66 kbp, ATG 下游长度为 87 kbp) 完成了表达 *Abcb1* 的 BAC 表达载体 (图 1)。获得 15 只 F0 代大鼠, 提取其基因组 DNA, PCR 鉴定, 共获得 4 只表达全长 *hAbcb1* 的首建鼠 (图 2)。但只有 3 只首建鼠能稳定传代。提取大鼠的心脏、肝脏、肾脏、肺、脑的 RNA^[13], RT-PCR 方法分析 *Abcb1* 的 RNA 水平表达情况, 结果表明 3 个转基因大鼠系 (2 号, 5 号和 8 号) 的脑组织均有 *Abcb1* 基因的表达, 但是只有 5 号转基因大鼠系的心脏组织有 *Abcb1* 基因的表达, 并且在肝脏, 肺和脑组织中 *Abcb1* 的表达量最高 (图 3)

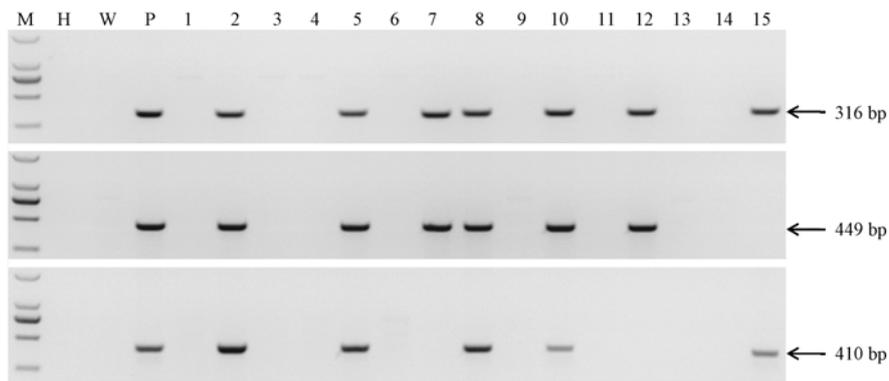


图 1 BAC-*Abcb1* 细菌人工染色体结构图

Fig. 1 The structure of BAC-*Abcb1*

2.2 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的制备

经显微注射, 得到 12 只首建鼠, 经基因型鉴定, 筛选获得三只 (1 号, 5 号和 9 号) 首建鼠系 (图 4A), 并对这三只首建鼠系的扩增产物进行测序分



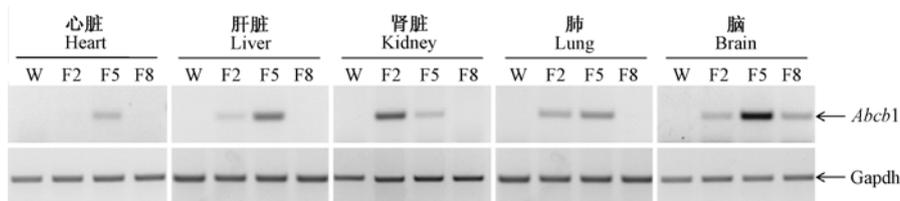
注: M: Marker DL2000; H: 水; W: 阴性对照; P: 阳性对照; 1-15 为 F0 代大鼠编号。2, 5, 8, 10 为阳性首建鼠。

图 2 PCR 鉴定 BAC-Abcb1 大鼠基因型

Note: M: DNA molecular weight marker DL2000; H: H₂O; W: Negative control; P: Positive control;

1-15: rats were generated by microinjection, 2, 5, 8, 10 were four positive founders.

Fig. 2 Identify the genotype of the BAC-Abcb1 rats by PCR



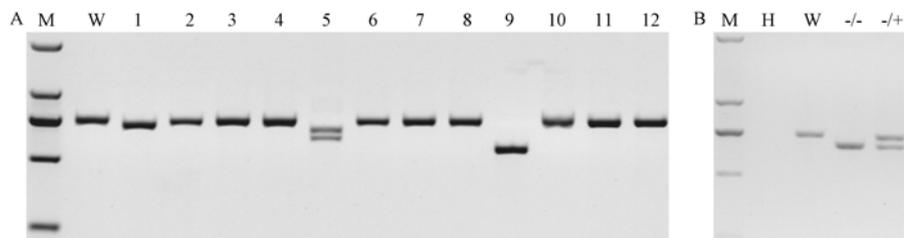
注: W: 阴性对照; F2, F5, F8 为 2, 5, 8 号首建鼠的子代鼠。F5 在心脏, 肝脏, 肾脏, 肺和脑均有 Abcb1 基因的表达。

图 3 RT-PCR 分析 Abcb1 在 F1 代大鼠中的基因表达情况

Note: W: Negative control; F2, F5 and F8 are generated by crossing founder 2, 5, 8 with wild type rats.

F5 has human Abcb1 expression in heart, liver, kidney, lung and brain.

Fig. 3 Abcb1 gene expression in F1 rats were analyzed by RT-PCR



注: M: Marker DL2000; H: 水; W: 阴性对照; A: 1-12 为通过显微注射产生的 F0 代大鼠编号。

B: 5 号首建鼠子代鉴定, 缺失突变可以传代。-/+ : Abcb1 杂合子大鼠; -/- : Abcb1 基因敲除纯合子大鼠。

图 4 Abcb1b 基因敲除大鼠的基因型鉴定

Note: M: DNA molecular weight marker DL2000; H: H₂O; W: Negative control; A: 1-12: Rats generated by microinjection.

B: The off springs of founder 5 were identified by PCR, The mutation can be transmitted.

-/+ : Abcb1 heterogeneous rat. -/- : Abcb1 homozygous rat.

Fig. 4 Identify the genotype of the Abcb1b knockout rats by PCR

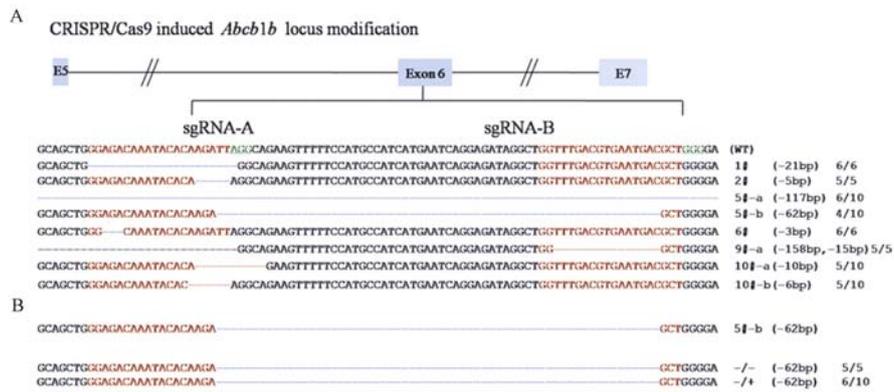
析, 确定了 CRISPR/Cas9 对 Abcb1b 的基因修饰情况 (图 5A)。

分析发现 5 号首建鼠系含有 62 bp 的 DNA 片段缺失, 该缺失造成了 Abcb1b 基因的移码突变, 并提前产生了终止密码子。我们将 5 号首建鼠系与野生型大鼠交配, 对子代大鼠进行基因型鉴定 (图 4B),

测序结果表明该缺失能够稳定遗传 (图 5B)。

2.3 Abcb1 人源化大鼠的培育

将 Abcb1b 基因敲除大鼠和 hAbcb1-BAC 转基因大鼠杂交, 最终获得 rAbcb1b 基因敲除和表达 hAbcb1 的大鼠, 即为人源化 Abcb1 大鼠。6 号为 Abcb1 人源化大鼠 (图 6A、B)。



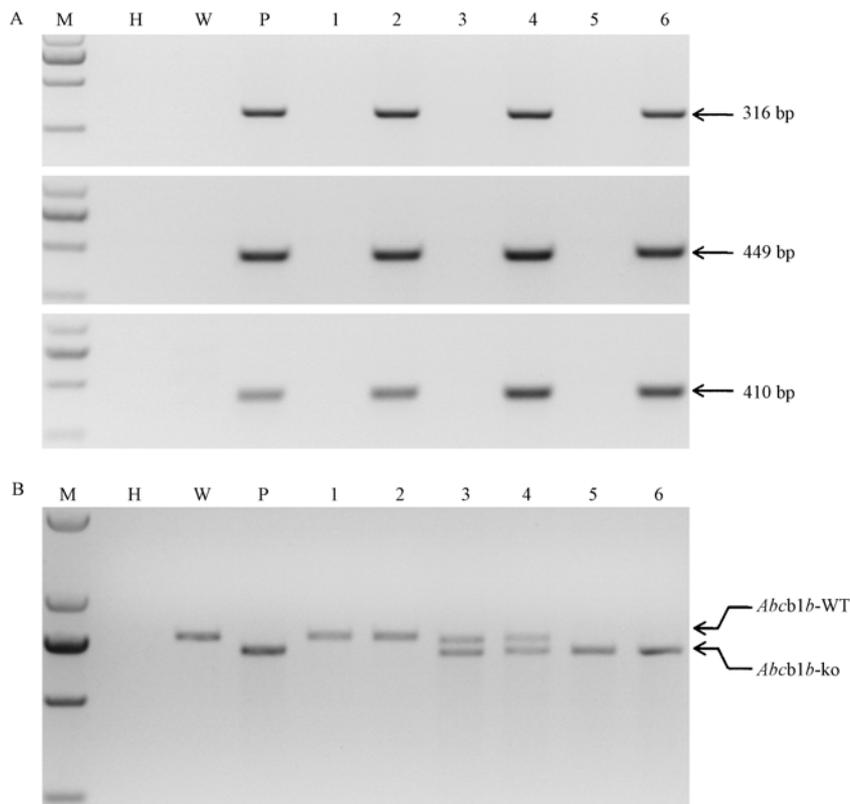
注：PAM 基序表示为绿色加下划线；靶点用红色表示；突变蓝色表示；插入 (+)，缺失 (-)。N/N 表示检测的克隆数和阳性数。A：首建鼠测序结果。D：子代大鼠测序结果。

图 5 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的测序结果分析

Note: The PAM sequence is underlined and highlighted in green; the targeting site are red; the mutations are blue; deletions (-) are shown to the right of each allele. N/N Indicates positive colonies out of total sequenced.

A: The sequence result of founder rats. D: Sequencing result of offspring rat.

Fig. 5 The sequence result analysis of *Abcb1b* knockout rat model

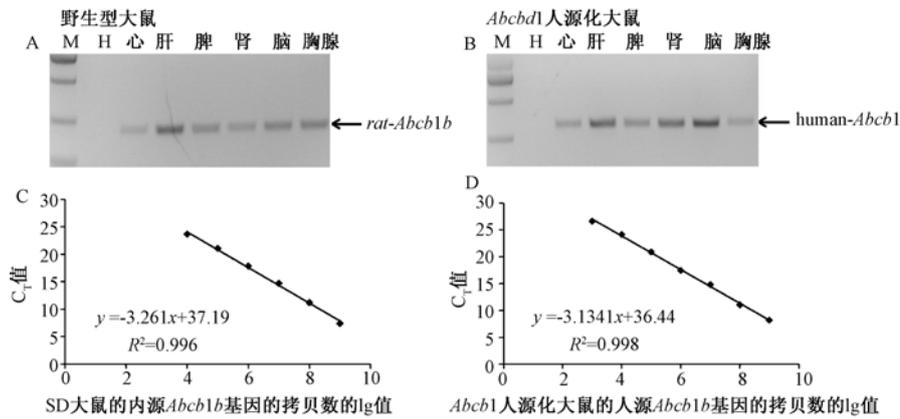


注：M；Marker DL2000；H；水；W；阴性对照；P；阳性对照。1-6；由 BAC-*Abcb1* 大鼠与 *Abcb1b* 敲除大鼠杂交产生的子代。A；2, 4, 6 为转基因阳性鼠；1, 3, 5 号为转基因阴性鼠。B；1, 2 号为野生型大鼠；3, 4 号为 *Abcb1b* 基因敲除杂合子大鼠；5, 6 号为 *Abcb1b* 基因敲除纯合子大鼠。6 号为 *Abcb1* 人源化大鼠。

图 6 *Abcb1* 人源化大鼠的鉴定

Note: M; DNA molecular weight marker DL2000; H; H₂O; W; Negative control. P; Positive control. 1-6; Rats were got by crossing BAC-*Abcb1* rat with *Abcb1b* knock out rat. A; 2, 4, 6 are transgenic positive rats; 1, 3, 5 are transgenic negative rat. B; 1, 2 are wild type rat; 3, 4 are *Abcb1b* heterogeneous rat; 5, 6 are *Abcb1b* homozygous rats. 6 is the humanized *Abcb1* rat.

Fig. 6 Generation of humanized *Abcb1* rat



注:A. 琼脂糖电泳检测 RT-PCR 产物,检测野生型大鼠的 *Abcb1b* 表达情况。B. 琼脂糖电泳检测 RT-PCR 产物,检测 *Abcb1* 人源化大鼠的 *Abcb1* 表达 C. *Abcb1*-human 质粒 10 倍系列稀释的标准曲线。D. *Abcb1b*-rat 质粒 10 倍系列稀释的标准曲线。

图 7 RT-PCR 检测野生型大鼠和人源化大鼠组织中 *Abcb1* mRNA 表达水平及 *Abcb1*-human 和 *Abcb1b*-rat 质粒 10 倍系列稀释的标准曲线

Note: A: The wild type rat RT-PCR products detected by agarose gel, analyzing the *Abcb1b* expression level in tissues.

B: The *Abcb1* humanized rat RT-PCR products detected by agarose gel, analyzing *Abcb1* expression level in tissues

C: The standard curve of 10-fold serial dilutions of *Abcb1b*-rat plasmid D: The standard curve of 10-fold serial dilutions of *Abcb1*-human plasmid.

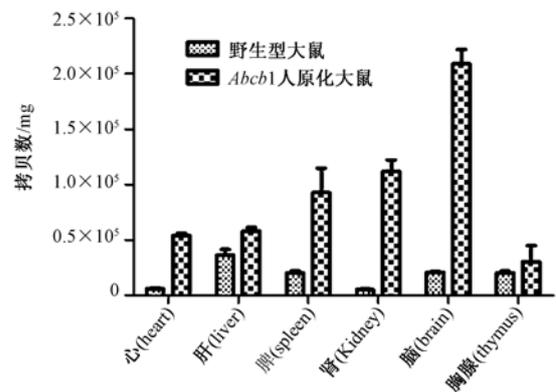
Fig. 7 The *Abcb1* mRNA expression level of wild type rat and *Abcb1* humanized rat in different tissues detected by RT-PCR and the standard curve of 10-fold serial dilution of *Abcb1*-human and *Abcb1b*-rat plasmid

2.4 *Abcb1* 人源化大鼠和野生型大鼠 *Abcb1b* 表达情况对比分析

以心、肝、脾、肾、脑、胸腺等组织的 cDNA 为模板,扩增 *Abcb1*,发现野生型大鼠体内肝脏和脑 *Abcb1b* 表达量高,心脏和肾脏表达量相对较低(图 7A、B)。人源化大鼠体内肝脏、肾脏和脑内 *Abcb1* 表达量高,心脏表达量较低。将携带有 *rAbcb1b* 基因及 *hAbcb1* 基因的质粒以 10 倍梯度系列稀释作为模板扩增得到的标准曲线 $R^2 > 0.99$,符合曲线要求(图 7C、D)。*Abcb1* 基因拷贝数经统计分析可以看出 *Abcb1* 人源化大鼠心脏的拷贝数达到 5×10^4 拷贝/mg,在肝脏为 5×10^4 拷贝/mg,脾脏为 8×10^4 拷贝/mg,肾脏为 1.2×10^5 拷贝/mg,脑为 2×10^5 拷贝/mg,心脏、脾脏、肾脏和脑中 *h-Abcb1* 的拷贝远高于 *r-Abcb1*,结果与琼脂糖凝胶电泳结果一致(图 8)。

3 讨论

制作人源化动物模型是研究人类基因功能的重要方法,人源化实验动物模型主要包括基因水平上的人源化动物模型以及细胞组织水平的人源化动物模型^[14]。基因水平的人源化动物模型制作主要有两种方法,一种为基因敲入的方法^[15-16],另一种是将动物的内源基因敲除后转入 BAC。与前者相



注:野生型大鼠和 *Abcb1* 人源化大鼠的 *Abcb1* 在心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑和胸腺每毫克拷贝数。

图 8 Real-time PCR 检测野生型大鼠和人源化大鼠组织中 *Abcb1* mRNA 表达水平

Note: The copy numbers of *Abcb1*-human and *Abcb1b*-rat in heart, liver, spleen, kidney, brain, thymus per milligram.

Fig. 8 The *Abcb1* mRNA expression level of wild type rat and *Abcb1* humanized rat in different tissues detected by Real-time PCR

比,BAC 法^[17]不仅将待研究的目的基因转入到动物体中,而且其启动子及上下游的调控序列也同时被转入动物体中,更好模拟人类基因功能。

P-糖蛋白最早于 1976 年由 Juliao 和 Ling 等^[18]在秋水仙碱耐药的中国仓鼠卵巢细胞中发现,但随

后的研究表明其广泛存在于机体的各个组织^[19], P-糖蛋白是第一个被发现的人类 ABC 转运蛋白, 之后在啮齿类动物中也发现了此类蛋白, 它是一种能量性依赖的跨膜输出泵, 可将抗肿瘤药物逆浓度从细胞内转运至细胞外, 降低胞内浓度并导致多药耐药现象的产生。人体中 P-糖蛋白首先在肿瘤细胞中发现, 之后的研究表明它在人体正常组织中也广泛表达, 例如肠道上皮细胞, 肝细胞毛细胆管膜, 肾近曲小管上皮细胞, 血脑屏障毛细血管内皮细胞等。它能防止机体对有害物质的吸收和介导物质的输出, 保护大脑, 睾丸, 胎儿等重要器官, 人体中 *Abcb1* 基因控制表达的 P-糖蛋白与药物分布和转运密切相关^[20]。P-糖蛋白能利用机体中的 ATP 将已进入细胞的外源性的药物毒物转运出来, 降低细胞内药物毒物浓度^[21]。

种属差异是造成药物在临床试验后被淘汰的原因之一^[22-24], 制备稳定可靠的实验动物模型是关系到实验结果真实可靠的重要影响因素^[25]。

大鼠基因组中, 有两个同源基因 *Abcb1a* 及 *Abcb1b* 编码 P-糖蛋白, 二者氨基酸序列相似性为 85%, 与同源的人类 *Abcb1* 的氨基酸相似性 > 80%, 大鼠的 *Abcb1a* 及 *Abcb1b* 基因与人类的 *Abcb1* 基因同样对抗抗癌药物, 阻止其进入靶器官。*Abcb1a* 与 *Abcb1b* 基因在组织器官的分布不同但总体情况与人类的 *Abcb1* 基因是一致的, 它们与人类的 *Abcb1* 基因承担着相同的功能。*Abcb1a* 主要分布在大脑, 小肠, 肝脏, 肾脏, 而 *Abcb1b* 主要分布在肾上腺, 子宫内膜, 子宫, 卵巢, 胎盘, 肝脏, 肾脏及脑实质^[1]。本研究用人源的 *Abcb1* 基因替换了大鼠的 *Abcb1b* 基因, 为 *Abcb1* 相关药物提供实验动物模型, 而用人源的 *Abcb1* 基因替代 *Abcb1a* 及 *Abcb1b* 双基因的模式我们将在接下来的工作中进行研究。

本研究制作出的 *Abcb1* 人源化实验动物模型, 其内源的 *Abcb1b* 基因采用 CRISPR/Cas9^[26-27] 的方法敲除, 与锌指核酶 (ZFNs) 技术^[28]、转录激活样效应因子 (Talens) 技术^[29] 相比, 设计和构建过程相对简单。

根据从 Expression Atlas (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) 得到的基于微阵列和 RNA 序列分析的信息, 人体中主要组织 *Abcb1* 表达水平从高到低依次为肾 (29), 肝 (17), 胸腺 (1), 心 (0.7), 在人体大脑组织中也有 *Abcb1* 基因表达^[30-31]。从本研究中可以看出在野生型大鼠体内各组织 *Abcb1b* 表达

水平从高到低为肝, 脑, 心, 肾。本研究培育出的 *Abcb1* 人源化大鼠体内转入的 *Abcb1*-BAC 片段是完整的, 经过 Real-time PCR 的方法定量分析显示 *h-Abcb1* 在大鼠体内按表达量高低排序为脑, 肾, 肝, 心, 这与人体中 *Abcb1* 在各组织表达趋势是一致的。

因此, 本研究建立的 *Abcb1* 人源化动物模型组织表达谱更接近人类, 为相关药物分析及评价提供了有价值的实验动物模型。

参考文献:

- [1] E. M. Leslie, R. G. Deeley, S. P. Cole. Multidrug resistance proteins; role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204 (3) : 216 - 237.
- [2] E. Choong, M. Dobrin, P. A. Carrupt, et al. The permeability P-glycoprotein; a focus on enantioselectivity and brain distribution [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2010, 6 (8) : 953 - 965.
- [3] J. Ferte. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267 (2) : 277 - 294.
- [4] P. Kwan and M. J. Brodie. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2005, 46 (2) : 224 - 235.
- [5] Y. Romsicki and F. J. Sharom. The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein—modulation by interaction with defined phospholipids [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 256 (1) : 170 - 178.
- [6] A. Abbott. Laboratory animals; the Renaissance rat [J]. *Nature*, 2004, 428 (6982) : 464 - 466.
- [7] L. Su, P. Jenardhanan, D. D. Mruk, et al. Role of P-glycoprotein at the blood-testis barrier on adjuvant distribution in the testis; a revisit of recent data [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 763 : 318 - 333.
- [8] A. E. Hudson and H. C. Hemmings, Jr. Are anaesthetics toxic to the brain? [J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107 (1) : 30 - 37.
- [9] J. J. Harrington, G. Van Bokkelen, R. W. Mays, et al. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes [J]. *Nat Genet*, 1997, 15 (4) : 345 - 355.
- [10] H. Shizuya, B. Birren, U. J. Kim, et al. Cloning and stable maintenance of 300 - kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (18) : 8794 - 8797.
- [11] L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339 (6121) : 819 - 823.
- [12] P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339 (6121)

- :823–826.
- [13] A. Peinnequin, C. Mouret, O. Birot, *et al.* Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green[J]. *BMC Immunol*, 2004, 5 :3.
- [14] K. Yoshizato and C. Tateno. A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection; where to next? [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9 (11) :1419–1435.
- [15] M. D. Swain, K. L. Orzechowski, H. L. Swaim, *et al.* P-gp substrate-induced neurotoxicity in an Abcb1a knock-in/Abcb1b knock-out mouse model with a mutated canine ABCB1 targeted insertion[J]. *Res Vet Scil*, 2013, 94 (3) :656–661.
- [16] Y. Ma, J. Ma, X. Zhang, *et al.* Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9[J]. *FEBS J*, 2014, 281 (17) :3779–3790.
- [17] Y. Kazuki and M. Oshimura. Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models[J]. *Mol Therl*, 2011, 19 (9) :1591–1601.
- [18] S. F. Zhou. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition[J]. *Xenobiotical*, 2008, 38 (7–8) :802–832.
- [19] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84 (21) :7735–7738.
- [20] R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, *et al.* Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy[J]. *Pharmacol Therl*, 2014,
- [21] S. Fellner, B. Bauer, D. S. Miller, *et al.* Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo[J]. *J Clin Investl*, 2002, 110 (9) :1309–1318.
- [22] H. Y. Kay, H. Wu, S. I. Lee, *et al.* Applications of genetically modified tools to safety assessment in drug development[J]. *Toxicol Resl*, 2010, 26 (1) :1–8.
- [23] 宋书元. 新药临床前药理毒理研究与临床试验的关系[J]. *中国临床药理学杂志*, 1991, (02) :80–84.
- [24] 袁伯俊, 顾长虹. 临床药理评价不可忽视的问题—比较药理学研究[J]. *中药新药与临床药理*, 1996, (01) :45–47.
- [25] 杜冠华. 药物临床前研究与转化医学—实验动物的应用与动物实验[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, (Z1) :24–26.
- [26] Y. Ma, L. Zhang and X. Huang. Genome modification by CRISPR/Cas9[J]. *FEBS J*, 2014, 281 (23) :5186–5193.
- [27] 马元武, 马婧, 路迎冬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1(Irs1) 基因[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, (03) :55–60.
- [28] A. M. Geurts, G. J. Cost, Y. Freyvert, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. *Sciencel*, 2009, 325 (5939) :433.
- [29] Y. H. Sung, I. J. Baek, D. H. Kim, *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting[J]. *Nat Biotechnoll*, 2013, 31 (1) :23–24.
- [30] D. S. Miller. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier [J]. *Trends Pharmacol Scil*, 2010, 31 (6) :246–254.
- [31] S. Gazzin, N. Strazielle, C. Schmitt, *et al.* Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCB1 and ABCG1 between blood-brain interfaces [J]. *J Comp Neuroll*, 2008, 510 (5) :497–507.

[修回日期]2015-02-04