



中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856, CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目: ApoE 基因敲除高脂血症兔的育种研究
作者: 黎桂玲, 萨楚拉, 刘月姝, 刘科, 朱叶萌, 郑佳琳, 谭巧燕, 邝少松, 王刚
收稿日期: 2025-10-23
网络首发日期: 2026-05-29
引用格式: 黎桂玲, 萨楚拉, 刘月姝, 刘科, 朱叶萌, 郑佳琳, 谭巧燕, 邝少松, 王刚. ApoE 基因敲除高脂血症兔的育种研究[J/OL]. 中国比较医学杂志.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260529.1438.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

ApoE 基因敲除高脂血症兔的育种研究

黎桂玲¹, 萨楚拉^{1,2}, 刘月姝¹, 刘科¹, 朱叶萌¹, 郑佳琳¹, 谭巧燕¹,
邝少松¹, 王刚¹✉

(1.广东省医学实验动物中心, 南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院), 广东 佛山 528248; 2.五邑大学药学与食品工程学院, 广东省医学大动物模型重点实验室, 广东 江门 529020)

*通信作者 王刚(1966—), 男, 正高级兽医师, 研究方向: 实验动物繁育。E-mail: wangzhy@21cn.com

摘要 目的 本研究旨在培育载脂蛋白 E (ApoE) 基因敲除兔, 探究其表型特征及繁育性能, 建立 ApoE 基因敲除兔的育种技术体系。方法 采用 CRISPR/CAS9 基因编辑技术和胚胎移植技术构建 ApoE 基因敲除兔, 通过基因型筛选健康的 ApoE 基因敲除兔作为种兔, 结合近交或回交方式进行选种扩繁, 对 ApoE 基因敲除兔进行血常规、血脂生化检测和病理检查表型分析, 并评估其繁殖性能, 从而筛选出遗传稳定且表型明显的 ApoE 基因敲除兔。结果 成功获得 ApoE^{-/-}兔群体, 正常饮食下, 其胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)显著高于新西兰兔($P<0.01$), 表现出脂质代谢紊乱和动脉粥样硬化的病理特征, 其繁殖性能及生长发育与新西兰兔无显著性差异。结论 本研究成功制备并筛选出遗传稳定、表型明显的 ApoE 基因敲除兔, 建立了有效的育种技术体系, 为心血管及相关代谢疾病的机制研究提供了重要的动物模型。

关键词 ApoE; 兔; CRISPR/CAS9; 育种; 高脂血症; 动脉粥样硬化

中图分类号 Q953; S813; R589.2 文献标志码 A

Breeding of ApoE gene-knockout hyperlipidemic rabbits

LI Guiling¹, SA Chula^{1,2}, LIU Yueshu¹, LIU Ke¹, ZHU Yemeng¹, ZHENG Jialin¹, TAN Qiaoyan¹, KANG Shaosong¹,

WANG Gang¹✉

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Foshan 528248, China. 2. School of Pharmacy and Food Engineering, Wuyi University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Large Animal Models for Biomedicine, Jiangmen 529020)

Abstract Objective To develop ApoE gene-knockout rabbits, investigate their phenotypic characteristics and reproductive performance, and establish a breeding technology system for ApoE gene-knockout rabbits. Methods ApoE gene-knockout rabbits were constructed using CRISPR/Cas9 gene-editing technology with embryo transplantation. Healthy ApoE gene-knockout rabbits were screened by genotyping to serve as breeding stock and their selection and expansion were conducted by inbreeding or backcrossing. Phenotypic analysis included routine blood tests, lipid biochemical assays, and pathological examination. Reproductive performance was also evaluated to select genetically stable ApoE gene-knockout rabbits with distinct phenotypes. Results An ApoE^{-/-} rabbit population was successfully established. Under a normal diet, total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels were significantly higher in ApoE^{-/-} than in New Zealand rabbits ($P<0.01$), exhibiting pathological features of lipid metabolism disorder and atherosclerosis. There were no significant differences in reproductive performance and growth development between ApoE^{-/-} and New Zealand rabbits. Conclusions This study successfully produced and selected genetically stable and phenotypically distinct ApoE gene-knockout rabbits, establishing an effective breeding technology system. These rabbits provide an important animal model for studying the mechanisms of cardiovascular and related metabolic diseases.

收稿日期: 2025-10-23

基金项目: 广东省科技计划项目(2019A030317012); 广东省医学科研基金项目(B2024060)。

作者简介: 黎桂玲(1991—), 女, 硕士, 兽医师, 研究方向: 动物繁育及疾病模型制备。E-mail: 793542539@qq.com

网络首发时间: 2026-05-29 16:08:52 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260529.1438.004>

Key words ApoE; rabbits; CRISPR/Cas9; breeding; hyperlipidemia; atherosclerosis

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 广泛分布于中枢神经系统 and 外周组织, 参与胆固醇代谢、脂质转运和清除, 是脂质代谢的重要调节因子^[1]。ApoE 通过介导低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 和极低密度脂蛋白 (very low-density lipoprotein, VLDL) 等脂蛋白的清除, 调节血液胆固醇水平。近年来的研究进一步揭示, ApoE 基因的缺失或突变会导致血脂水平异常, 增加患高脂血症及心血管疾病的风险^[2,3]; 同时, ApoE 功能异常通常与血管壁的炎症反应及氧化应激增强等有关^[4,5], 这些改变进而推动动脉粥样硬化的进展。在心血管及相关代谢疾病的机制研究中, ApoE 基因敲除动物模型发挥了不可替代的作用, 该模型能准确模拟人体高脂血症和动脉粥样硬化的病理特征, 有助于揭示相关疾病的机制研究及筛选治疗靶点^[6,7]。相比小鼠模型, 兔子在生理和代谢特征上更接近人类^[8,9], 其较大的体型和相对较短的生长周期, 便于成像、手术和长期观察等实验操作, 在心血管疾病研究中展现出更多的优势, 因此开发并完善 ApoE 基因敲除兔模型的育种技术, 对心血管疾病模型的建立与心血管疾病的临床转化研究具有重要意义。

兔作为脂质代谢模型动物的优势日益凸显, 相关研究已尝试通过基因编辑技术构建 ApoE 基因敲除兔^[10], 但在高效制备、精准选种及稳定繁育等方面仍存在技术挑战, 系统性研究较少, 对基因编辑兔遗传稳定性、优良品系的制备选育体系尚不完善。随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展与成熟, 构建 ApoE 基因敲除兔模型不仅能够模拟人类心血管疾病的病理状态, 还能为药物研发和疾病机制的探索提供更为理想的动物平台。因此, 制备、选种及繁育具有稳定遗传背景的 ApoE 基因敲除兔模型, 为探究其生物学功能提供了新的视角。

本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和辅助生殖技术构建 ApoE 基因敲除兔, 结合分子生物学技术和传统的遗传学繁育技术, 科学的选种与繁育, 优化种群遗传背景, 获得遗传稳定、表型明显的动物模型, 同时建立标准繁育体系。通过解决现有模型制备效率低、遗传背景复杂和繁育技术不足的问题, 推动 ApoE 基因敲除兔在心血管疾病及代谢研究中的广泛应用, 为研究相关疾病的发病机制及开发临床干预策略提供可靠的动物模型支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

新西兰雌兔 8 只、雄兔 3 只, 普通级, 体质量 3.0~4.0 kg, 6~12 月龄, 均由广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2023-0035]提供; ApoE 基因敲除兔模型由广东省医学实验动物中心构建, 遗传背景为新西兰兔[SCXK(粤)2023-0035]。实验动物饲养于广东省医学实验动物中心普通级环境[SYXK9(粤)2022-0002], 温度 16~25 °C, 湿度 30%~70%, 通风良好, 12 h/12 h 昼夜交替, 自由饮食饮水。该动物实验和饲养经广东省医学实验动物中心动物福利伦理审查批准 (B202309-14、B202311-3)。

1.2 主要试剂与仪器

HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (E2050S, NEB, 美国); Cas9 蛋白 (Z03389, 金斯瑞生物科技股份有限公司, 美国); 2×Fast Pfus PCR Master Mix (G3305, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG, 22111102)、人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG, 220912)、促性腺素释放素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH, 230217) 均购自杭州动物药品厂; 甘油三酯 (triglycerides, TG, 202309121)、总胆固醇 (total cholesterol, TC, 202309121)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C, 202309121)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C, 202311121) 均购自上海科华生物工程股份有限公司; 无水乙醇 (20250319, 广东光华科技股份有限公司); 曙红 (醇溶) (C17516218)、苏木素 (C16474681) 均购自上海麦克

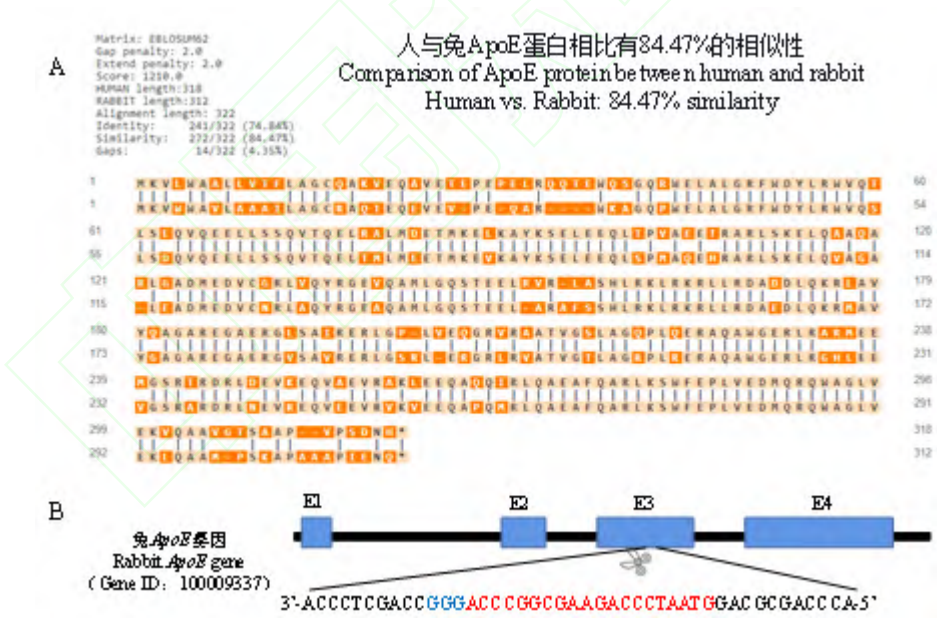
林生化科技有限公司；AMPure XT beads 回收试剂盒、Agilent Bioanalyzer 2100 文库定量试剂盒、Illumina 文库定量试剂盒、NovaSeq 6000 SP Reagent Kit 均由广州艾基生物技术有限公司提供。

体视显微镜（ZSA302T，重庆光电仪器有限公司）；二氧化碳培养箱（热电 3111，Thermo Fisher Scientific，美国）；PCR 仪（ETC811，苏州东胜兴业科学仪器有限公司）、水平电泳仪（DYCP-31DN，北京六一生物科技有限公司）；显微操作仪（DMi8，Leica，德国）；微电级拉制仪（MP-500，深圳瑞沃德生命科技有限公司）；锻针仪（MF-900，NARISHIGE，日本）；全自动脱水机（ASP300S）、生物组织包埋机（EG1150）、轮转切片机（RM2235）、自动染色机（AutoStainer-XL）均购自 Leica Microsystems，德国；生物显微镜/图像分析软件（BX43/CellSens，OLYMPUS Corporation，日本）；全自动生化分析仪（HITACHI 7020，日立高新技术株式会社，日本）；全自动血液细胞分析仪（Mindray BC-5000，深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）；NovaSeq 6000 测序仪（NovaSeq 6000，Illumina，Inc.，美国）。

1.3 实验方法

1.3.1 *ApoE* 基因敲除高脂血症兔模型建立

对比人类和新西兰兔的 *ApoE* 蛋白序列，氨基酸序列相似度达到 84.47%，提示兔与人类之间的 *ApoE* 基因在功能上存在极高的相似度（图 1A）。参考 Chen 等^[8]、刘天平等^[11]基因编辑兔的构建方法，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和辅助生殖技术构建 *ApoE* 基因敲除兔模型，sgRNA 序列：5'-GTAATCCCAGAAGCGGCCCA-3'，PAM：GGG（图 1B）。通过 PCR 和 Sanger 测序检测对出生的仔兔进行基因型鉴定，PCR 引物为 *ApoE*-F：5'-CAAGGCCCATCAGTGTGTTTGC-3'，*ApoE*-R：5'-AAAGGCATCTAGACTGGCCG-3'，退火温度 60 °C，产物大小 357 bp。鉴定方法参考已发表文章^[12]。



注：A：人与兔 *ApoE* 蛋白序列比对；B： *ApoE* 基因 sgRNA 靶点设计；蓝色字母为 PAM 序列，红色字母为 sgRNA 序列。

Figure 1 Amino acid sequence alignment and sgRNA target sites of the *ApoE* gene

1.3.2 *ApoE* 基因敲除兔的繁殖性能测定

挑选生长健康、发育良好的 6 月龄 F0 代 *ApoE* 基因敲除母兔（发情期）与公兔进行兄妹同胞近

亲交配或人工受精，2 d 后进行复配，记录母兔的窝产仔数、断奶仔数、初生体质量和断奶体质量。同龄的新西兰兔作为野生型（wild-type，WT）对照进行同步操作。待 F1 代 *ApoE* 基因敲除兔 6 月龄时，公母兔近交或者回交。繁殖到 F3 代，对突变率进行统计。利用人工辅育技术提高仔兔的成活率^[13]。

1.3.3 血常规、血清生化检测

分别对 7 月龄的 *ApoE* 基因敲除兔和同龄的新西兰兔耳缘静脉采血，其中 1~2 mL 血液置于 EDTA 抗凝管内进行血常规检测，剩余血液 3 000 r/min 离心 15 min，取上清液进行 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 检测。

1.3.4 组织学切片观察

分别采集 7 月龄、9 月龄 *ApoE* 基因敲除兔及新西兰兔的心脏和肝等组织，使用 4%多聚甲醛固定，进行脱水、包埋、切片和脱蜡等处理。制备好的石蜡切片进行 HE 染色处理，并用中性树胶固定，显微镜下观察并采集图像。

1.4 统计学方法

利用 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理及差异性分析，多组均值比较采用两因素方差分析（TWO-WAY ANOVA）方法，组间两两比较选用 *t* 检验法。数据均用平均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，以 *P*<0.05 表示有显著性差异，*P*<0.01 表示差异极显著。

2 结果

2.1 *ApoE* 基因敲除兔基因型鉴定

将 F0 代、F1 代仔兔经 PCR 扩增后进行测序和基因型比对，结果发现：F0 代出现 *ApoE* 杂合敲除兔（*ApoE*^{+/-}杂合子），F1 代出现 *ApoE* 纯合敲除兔（*ApoE*^{-/-}纯合子）（表 1）。

表1 *ApoE*基因敲除兔突变类型
Table 1 Mutation types of *ApoE* gene-knockout rabbits

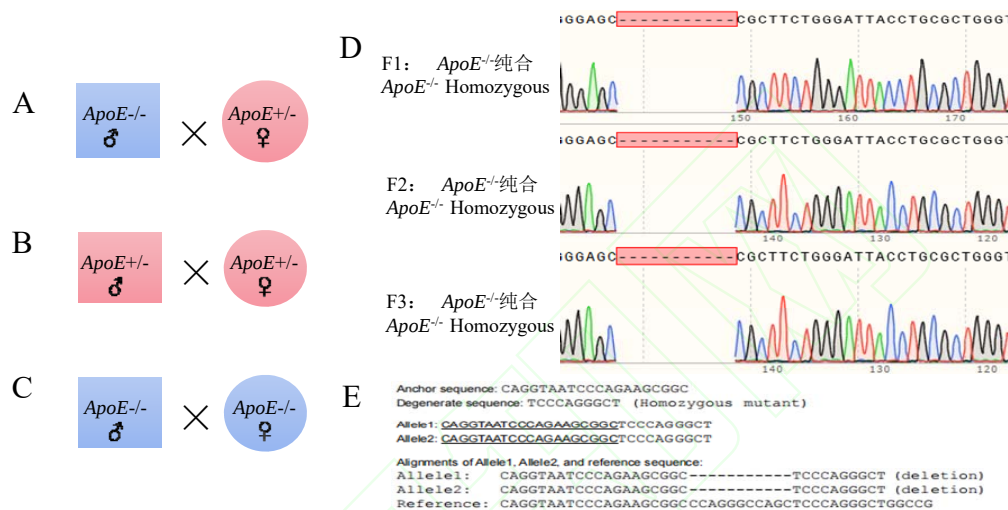
<i>ApoE</i> 基因敲除兔 <i>ApoE</i> gene-knockout rabbits		基因型序列（5'-3'） Genotype sequence（5'-3'）	
代数 Generation	基因型 Genotype	sgRNA	PAM
		CAGGTAATCCCAGAAGCGGCCAGGGCCAGCTCCCAG（WT）	
F0	<i>ApoE</i> ^{+/-}	CAGGTAATCCCAGAAGCGGC-----TCCCAG（-11 bp）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGCCAGGGCCAGCTCCCAG（WT）
	<i>ApoE</i> ^{-/-} （杂合） <i>ApoE</i> ^{+/-} （Heterozygosity）	CAGGTAATCCCAG-----CTCCCAG（-17 bp）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGCC-AGGGCCAGCTCCCAG（-1 bp）
		CAGGTAATCCCAGAAGCGGC-----TCCCAG（-11 bp）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGCCAGGGCCAGCTCCCAG（WT）
	<i>ApoE</i> ^{+/-}	CAGGTAATCCCAG-----CTCCCAG（-17 bp）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGCCAGGGCCAGCTCCCAG（WT）
F1		CAGGTAATCCCAGAAGCGGCCAGGGCCAGCTCCCAG（WT）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGCC-AGGGCCAGCTCCCAG（-1 bp）
	<i>ApoE</i> ^{-/-} （纯合） <i>ApoE</i> ^{-/-} （Homozygous）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGC-----TCCCAG（-11 bp）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGC-----TCCCAG（-11 bp）
	<i>ApoE</i> ^{+/-} （杂合） <i>ApoE</i> ^{+/-} （Heterozygosity）	CAGGTAATCCCAGAAGCGGC-----TCCCAG（-11 bp）	CAGGTAATCCCAG-----GGCCAGCTCCCAG（-11 bp）
		CAGGTAATCCCAG-----GGCCAGCTCCCAG（-11 bp）	

注：蓝色为 PAM 序列，红色划线为 sgRNA 序列；WT 为野生型，未发生目标基因突变；+/- 表示单等位基因突变，-/- 表示双等位基因突变；- 表示删除；+ 表示增加。

Note. Blue sequences represent the PAM sites, red underlined sequences represent the sgRNA target sites. WT represents the wild type, no target gene mutation. '+/-' indicates a single-allele mutation, '-/-' indicates a double-allele mutation. '-' denotes deletion, '+' denotes insertion.

2.2 *ApoE* 基因敲除兔繁殖性能分析

选择生长健康的 F0 代 *ApoE*^{+/+} 兔作为种兔，种公兔基因型为 *ApoE*^{-/-} 兔和 *ApoE*^{+/+} 兔。*ApoE* 基因敲除母兔在 6 月龄分别近交配种（图 2A、2B）后均产下仔兔，平均每窝产仔数为（8.00±2.00）只，初生体质量为（51.25±4.30）g；断奶成活仔数为（7.67±1.53）只，断奶体质量为（1332.50±113.80）g，与新西兰兔繁殖性能相比无显著性差异（*P*>0.05）（图 3A、3B），基因突变率为 29.17%（表 2）。*ApoE* 基因敲除兔在普通环境下生长，其生长趋势与 WT 一致（图 3C）。选择健康的 F1、F2 代 *ApoE* 基因敲除公母兔近交或回交（F1 代：图 2A、2B，F2 代：图 2C），所产 F2、F3 代仔兔突变率分别为 86.67%、100%（表 2）。经比对，F1、F2 代和 F3 代的 *ApoE*^{-/-} 纯合兔基因型一致（图 2D、2E）。

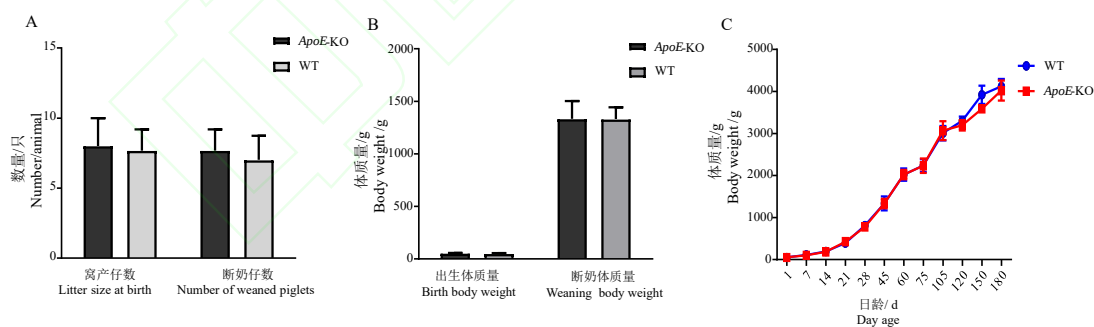


注：A~C：繁殖兔的基因型；D： *ApoE*^{-/-} 纯合兔 Sanger 测序结果；E：突变分析，-表示碱基删除。

图 2 选种繁育方式与 *ApoE*^{-/-} 纯合兔 Sanger 测序基因型突变分析

Note. A~C, Genotypes of breeding rabbits. D, Sanger sequencing results of *ApoE*^{-/-} homozygous rabbits. E Mutation analysis, '-' denotes a base deletion.

Figure 2 Breeding selection methods and sanger sequencing genotypic mutation analysis of *ApoE*^{-/-} homozygous rabbits



注：A：窝产仔数与断奶仔数；B：出生体质量与断奶体质量；C：生长曲线。

图 3 *ApoE* 基因敲除兔、新西兰兔生长发育与繁殖性能比较分析

Note. A, Litter size at birth and at weaning. B, Birth body weight and weaning body weight. C, Growth curve.

Figure 3 Comparative analysis of growth, development and reproductive performance between *ApoE* gene-knockout rabbits and New Zealand rabbits

表2 *ApoE*基因敲除兔F1-F3代繁殖突变率的评估
Table 2 Evaluation of mutation rates during breeding from F1 to F3 generation of *ApoE* gene-knockout rabbits

<i>ApoE</i> 基因敲除兔 <i>ApoE</i> gene-knockout rabbits		数量/只 Quantity/animal	产仔总数/只 Litter size/animal	突变率/% Mutation rate/ %
代数 Generation	基因型 Genotype			
F1	<i>ApoE</i> ^{+/+}	4		
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (杂合) <i>ApoE</i> ^{+/-} (Heterozygosity)	2	24	29.17
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (纯合) <i>ApoE</i> ^{-/-} (Homozygous)	1		
F2	<i>ApoE</i> ^{+/+}	3		
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (杂合) <i>ApoE</i> ^{+/-} (Heterozygosity)	9	15	86.67
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (纯合) <i>ApoE</i> ^{-/-} (Homozygous)	1		
F3	<i>ApoE</i> ^{+/+}	2		
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (杂合) <i>ApoE</i> ^{+/-} (Heterozygosity)	5	9	100
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (纯合) <i>ApoE</i> ^{-/-} (Homozygous)	2		

2.3 血液生理指标

ApoE 基因敲除兔 (*ApoE*^{-/-}、*ApoE*^{+/-}) 与 WT 血常规比较结果显示: 在白细胞分类中, 白细胞计数、中性粒细胞百分比、淋巴细胞百分比三组间差异均极显著 ($P<0.01$); *ApoE*^{-/-}兔的中性粒细胞计数、嗜酸性粒细胞计数显著高于 *ApoE*^{+/-}兔和新西兰兔 ($P<0.01$); *ApoE*^{-/-}兔与 *ApoE*^{+/-}兔的淋巴细胞数差异不显著 ($P>0.05$), 但均显著低于新西兰兔 ($P<0.01$); *ApoE*^{-/-}兔与 *ApoE*^{+/-}兔的单核细胞计数与百分比差异不显著 ($P>0.05$), 但均显著高于新西兰兔 ($P<0.01$)。在红细胞分类中, *ApoE*^{-/-}兔与 *ApoE*^{+/-}兔的血红蛋白浓度和平均红细胞血红蛋白浓度差异均不显著 ($P>0.05$), 但均显著高于新西兰兔 ($P<0.01$)。在血小板分类中, *ApoE*^{-/-}兔与 *ApoE*^{+/-}兔的血小板计数、平均血小板体积差异不显著 ($P>0.05$), 但均显著低于新西兰兔 ($P<0.01$); 其余指标三组间无显著性差异 ($P>0.05$)。

表3 血常规检测 (n=6)
Table 3 Routine blood tests (n=6)

血液生理指标 Blood routine indexes	<i>ApoE</i> ^{-/-}	<i>ApoE</i> ^{+/-}	WT
白细胞计数/(10 ⁹ /L) White blood cell count / (10 ⁹ /L)	19.31±0.76 ^{bc}	11.30±0.84 ^{ac}	15.98±1.16 ^{ab}
嗜碱性粒细胞计数/(10 ⁹ /L) Basophil count/ (10 ⁹ /L)	0	0	0
中性粒细胞计数/(10 ⁹ /L) Neutrophil count/ (10 ⁹ /L)	12.33±0.30 ^{bc}	5.26±0.73 ^a	6.08±1.11 ^a
嗜酸性粒细胞计数/(10 ⁹ /L) Eosinophil count/ (10 ⁹ /L)	0.26±0.02 ^{bc}	0.11±0.01 ^a	0.17±0.07 ^a
淋巴细胞数/(10 ⁹ /L) Lymphocyte count/ (10 ⁹ /L)	5.21±0.12 ^c	5.00±0.09 ^c	9.69±0.24 ^{ab}
单核细胞计数/(10 ⁹ /L) Monocyte count/ (10 ⁹ /L)	1.50±0.44 ^c	0.93±0.32 ^c	0.04±0.01 ^{ab}
中性粒细胞百分比/% Neutrophil percentage/ %	63.9±1.75 ^{bc}	46.40±3.25 ^{ac}	37.87±4.48 ^{ab}
嗜酸性粒细胞百分比/% Eosinophil percentage/ %	1.41±0.09	0.93±0.12	1.08±0.13
淋巴细胞百分比/% Lymphocyte percentage/ %	27.75±1.71 ^{bc}	44.47±4.12 ^{ac}	60.88±4.46 ^{ab}
单核细胞百分比/% Monocyte percentage/ %	7.74±1.99 ^c	8.20±2.43 ^c	0.20±0.10 ^{ab}
红细胞计数/(10 ¹² /L) Red blood cell count/ (10 ¹² /L)	5.74±0.62	6.05±0.31	5.29±0.23
血红蛋白浓度/(g/L) Hemoglobin concentration/ (g/L)	126.67±11.37 ^c	132.33±7.77 ^c	111.00±5.20 ^{ab}
平均红细胞体积/fL Mean corpuscular volume/ fL	69.50±2.72	68.77±3.97	69.67±1.88
平均红细胞血红蛋白含量/pg Mean corpuscular hemoglobin/ pg	22.07±0.40	21.83±1.10	21.03±0.21
平均红细胞血红蛋白浓度/(g/L) Mean corpuscular hemoglobin concentration/ (g/L)	317.67±7.23 ^c	318.00±3.61 ^c	301.33±10.21 ^{ab}
红细胞分布宽度变异系数/%	12.30±0.60	13.00±1.08	14.70±0.35

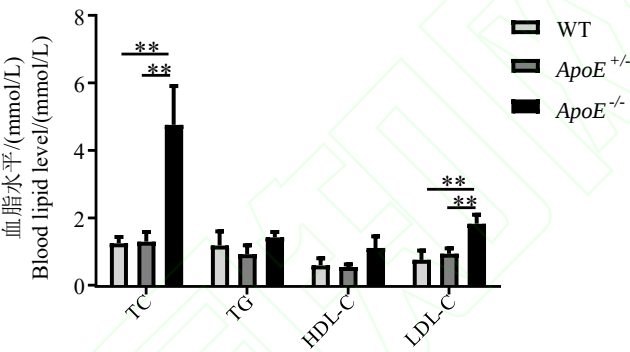
Red cell distribution width-coefficient of variation/ %			
红细胞分布宽度标准差/ fL	33.87±1.78	35.00±0.92	40.80±0.17
Red cell distribution width - standard deviation			
红细胞比容/ %	39.77±3.01	41.57±2.20	36.87±0.60
Hematocrit/ %			
血小板计数/(10 ⁹ /L)	412.67±92.96 ^c	336.33±64.47 ^c	597.00±82.31 ^{ab}
Platelet count/ (10 ⁹ /L)			
平均血小板体积/ fL	5.63±0.31 ^c	5.47±0.32 ^c	37±0.06 ^{ab}
Mean platelet volume/ fL			
血小板分布宽度	15.03±0.06	15.07±0.06	14.87±0.15
Platelet distribution width			
血小板比容/ %	0.23±0.04	0.19±0.04	0.32±0.04
Thrombocrit/ %			

注：与 *ApoE*^{-/-} 相比，^a*P*<0.01；与 *ApoE*^{+/-} 相比，^b*P*<0.01；与 WT 相比，^c*P*<0.01

Note. Compared with *ApoE*^{-/-}, ^a*P*<0.01. Compared with *ApoE*^{+/-}, ^b*P*<0.01. Compared with WT, ^c*P*<0.01.

2.4 血脂生化指标

血清生化指标显示，*ApoE*^{-/-} 兔的 TC、TG、HDL-C、LDL-C 均高于 *ApoE*^{+/-} 兔和 WT，且 TC、LDL-C 差异极显著（*P*<0.01）；*ApoE*^{+/-} 兔与 WT 血脂指标无显著性差异（*P*>0.05）。



注：与 *ApoE*^{-/-} 相比，***P*<0.01。

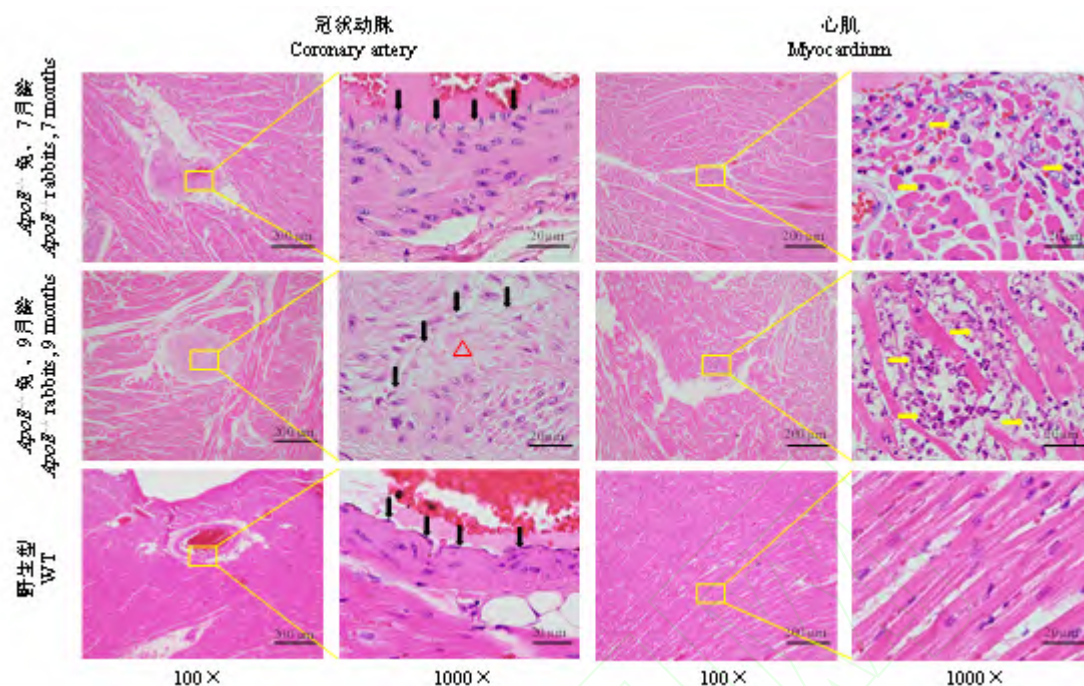
图 4 血脂四项对比图（*n*=6）

Note. Compared with *ApoE*^{-/-}, ***P*<0.01.

Figure 4 Comparison of four blood lipid parameters (*n*=6)

2.5 组织病理学

对 *ApoE* 基因敲除兔及 WT 的心脏、肝等组织器官进行石蜡切片及 HE 染色，经光镜下组织学检查发现：新西兰兔心脏冠状动脉血管内膜平滑，管壁厚度及管腔大小适中，内皮细胞为单层扁平上皮；7 月龄 *ApoE*^{-/-} 兔心脏冠状动脉可观察到血管壁增厚、管壁纤维组织增生、血管内皮细胞变性；9 月龄 *ApoE*^{-/-} 兔心脏冠状动脉管壁增厚更为明显，管腔狭窄，血管内皮细胞肿胀变性、局部内皮细胞脱落，血管内膜下可见泡沫样物质沉积，血管壁纤维组织排列疏松紊乱。此外，7 月龄、9 月龄 *ApoE*^{-/-} 兔均可观察到局部心肌纤维变性坏死、伴随单形核细胞浸润。*ApoE*^{-/-} 兔的肝脏与新西兰兔对比，未见明显的组织学改变。



注：7月龄 $ApoE^{-/-}$ 兔心脏冠状动脉血管壁增厚，内皮细胞胞核钝圆（黑色箭头），管壁纤维组织增生；9月龄 $ApoE^{-/-}$ 兔心脏冠状动脉血管壁明显增厚，血管内皮细胞变性肿胀（黑色箭头），内膜下泡沫样物质沉积（红色三角形），管壁纤维组织排列疏松紊乱；新西兰兔冠状动脉血管内膜平滑、内皮细胞为单层扁平上皮，管壁纤维组织排列紧致。7、9月龄 $ApoE^{-/-}$ 兔心肌组织，局部心肌纤维坏死崩解，单形核细胞浸润（黄色箭头）；新西兰兔心肌组织，肌纤维排列紧密，未见异常改变。

图 5 $ApoE^{-/-}$ 兔及新西兰兔心脏组织病理学检查（HE）

Note. The coronary artery walls of 7-month-old $ApoE^{-/-}$ rabbits were thickened, with rounded endothelial cell nuclei (black arrows) and fibrous hyperplasia in the vessel walls. In 9-month-old $ApoE^{-/-}$ rabbits, the coronary artery walls showed marked thickening, accompanied by degenerative swelling of vascular endothelial cells (black arrows), subintimal deposition of foam-like substances (red triangles), and loose, disordered arrangement of fibrous tissues in the vessel walls. In New Zealand rabbits, the coronary artery intima was smooth, the endothelial cells were a single layer of squamous epithelium, and the fibrous tissues in the vessel walls were tightly arranged. In the myocardial tissues of 7 and 9-month-old $ApoE^{-/-}$ rabbits, there was focal myocardial fiber necrosis and disintegration, along with mononuclear cell infiltration (yellow arrows). In contrast, the myocardial fibers of New Zealand rabbits were tightly arranged, with no abnormal changes observed.

Figure 5 Histopathological examination of cardiac tissues in $ApoE^{-/-}$ rabbits and New Zealand rabbits (HE)

3 讨论

本研究通过基因型筛查、表型分析及血脂指标检测，筛选出遗传稳定且表型符合预期的 $ApoE^{-/-}$ 兔高脂血症模型（图 2）。在正常饮食下，7月龄的 $ApoE^{-/-}$ 兔表现出较为典型的脂质代谢紊乱特征，血脂水平（TC、LDL-C）显著升高（ $P < 0.01$ ）（图 4），出现明显的高血脂特征^[14]。对比 $ApoE^{-/-}$ 小鼠模型在 18 周龄时通常表现出明显的动脉粥样硬化^[15]， $ApoE^{-/-}$ 兔模型则在 7 月龄开始表现出心肌纤维灶性坏死伴随炎症反应，冠状动脉管壁增厚，9 月龄冠脉系统出现早期血管粥样硬化样改变（图 5）。相比于小鼠模型，兔模型病变缓慢、渐进的动脉粥样硬化过程但更具有临床相似性，符合人类疾病模型的长期慢性进展。

$ApoE^{-/-}$ 兔的白细胞计数及中性粒细胞计数、嗜酸性粒细胞计数、单核细胞计数等炎性细胞均显著高于新西兰兔，而淋巴细胞数显著降低（ $P < 0.01$ ，表 2），这一结果表明 $ApoE$ 基因缺失引发血脂异常，不仅促进了脂质的沉积，更通过改变白细胞亚群的分布，激活和维持较强的炎症反应和免疫激活。淋巴细胞的减少，适应性免疫功能受到抑制，导致炎症反应失控，进一步加剧血管病变。研究证明 $ApoE$ 基因缺失可导致胆固醇异常积聚，引起体内脂质代谢紊乱，诱发动脉粥样硬化^[16]，而动脉粥样硬化病变的主要成分是中性粒细胞^[17, 18]。本研究培育的 $ApoE^{-/-}$ 兔完全符合该病理机制，进一步验证了 $ApoE$ 基因缺陷导致血脂异常，激活中性粒细胞和单核细胞等炎性细胞形成免疫炎症微环境^[19]，推动动脉粥样硬化的形成和发展的核心通路。 $ApoE^{-/-}$ 兔的血红蛋白浓度和血小板计数均出现显著性差

异 ($P < 0.01$, 表 2), 该现象说明 *ApoE* 基因缺失加剧血液粘稠和氧化应激^[20], 微环境改变, 加速斑块形成和发展, 从而影响红细胞携氧功能和血小板活化^[21], 进而导致血液系统多指标异常。血常规和血脂生化的指标变化表明了 *ApoE* 基因通过调节脂质代谢和免疫反应, 间接影响血液系统的相互作用, 从而反应机体的健康状态。

在模型繁育体系构建中, 本研究采用回交或近交的方法, 不断进行基因型筛选, 结合人工授精和自然交配的方式, 获得遗传稳定的 *ApoE*^{-/-}兔。由于 F0 和 F1 代的 *ApoE*^{-/-}兔均为公兔, 繁育 F1、F2 代选用 *ApoE*^{+/-}兔作为母本; F2 代获得 *ApoE*^{-/-}母兔后, 选用 *ApoE*^{-/-}公母兔繁育的 F3 代, 其突变率达到 100% (表 2)。*ApoE*^{-/-}兔 (♂) × *ApoE*^{+/-}兔 (♀) (图 2A)、*ApoE*^{+/-}兔 (♂) × *ApoE*^{+/-}兔 (♀) (图 2B) 和 *ApoE*^{-/-}兔 (♂) × *ApoE*^{-/-}兔 (♀) (图 2C) 三种繁育方式均能获得基因型一致的 *ApoE*^{-/-}纯合兔 (图 2C、2D), 说明基因突变可通过近交或回交稳定遗传。*ApoE* 基因敲除兔窝产仔数、断奶仔数、初生重、断奶重均与新西兰兔无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 3AB), 且 *ApoE* 基因敲除兔模型已正常繁育至 F3 代。上述结果表明利用 CRISPR/CAS9 技术制备的 *ApoE* 基因敲除兔具有良好的繁殖性能, *ApoE* 缺失对兔的繁殖能力及早期生长发育没有明显的负面影响 (图 3)。

本研究成功培育了遗传稳定、表型明确的 *ApoE*^{-/-}兔高脂血症模型, 为相关疾病的机制研究和药物筛选提供了理想的实验载体, 其建立的育种体系为其他基因编辑疾病模型的构建提供了技术参考。但本研究仍存在一定的局限性: 首先, 本研究仅聚焦于脂质代谢、免疫炎症及动脉粥样硬化相关表型, 未对 *ApoE* 基因缺失可能导致肝肾代谢异常等潜在未知表型进行探究, 后续仍需结合多器官病理及代谢组学分析完善模型评价体系; 其次, 本研究虽能稳定遗传至 F3 代, 繁殖性能良好, 但长期近交可能导致遗传漂变等现象, 增加后代出现生长迟缓, 免疫缺陷等健康风险概率, 后续需适当的增加种群数量维持种群的遗传多样性; 最后, 本模型是基于普通级新西兰兔构建, 未开展无菌动物或 SPF 级动物等层面验证, 难以直接阐明 *ApoE* 基因缺失与肠道微生态的互作关系, 后续可结合菌群移植等试验进一步拓展深度研究。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建了 *ApoE* 基因敲除兔模型, 通过近交或回交繁育, 筛选出表型明显且遗传稳定的 *ApoE* 基因敲除兔群体 (*ApoE*^{-/-}), 并建立了一套有效的育种技术体系。该模型为深入研究脂质代谢紊乱及动脉粥样硬化等相关疾病的发病机制提供了理想的动物模型, 也为相关疾病的药物开发和治疗策略优化奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1] JACKSON R J, HYMAN B T, SERRANO-POZO A. Multifaceted roles of APOE in Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2024, 20(8): 457-474.
- [2] PHU T A, NG M, VU N K, et al. ApoE expression in macrophages communicates immunometabolic signaling that controls hyperlipidemia-driven hematopoiesis & inflammation via extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(8): e12345.
- [3] MCMASTER M W, SHAH A, KANGARLU J, et al. The impact of the apolipoprotein E genotype on cardiovascular disease and cognitive disorders [PP/OL]. PubMed, (2024-04-25) [2026-06-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38661359/>.
- [4] HE L, CHEN Q, WANG L, et al. Activation of Nrf2 inhibits atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice through suppressing endothelial cell inflammation and lipid peroxidation [J]. *Redox Biol*, 2024, 74: 103229.
- [5] WEN J, SUN H, YANG B, et al. Long-term polystyrene nanoplastic exposure disrupt hepatic lipid metabolism and cause atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *J Hazard Mater*, 2024, 466: 133583.
- [6] LIU B, FANG L, MO P, et al. Apoe-knockout induces strong vascular oxidative stress and significant changes in the gene expression profile related to the pathways implicated in redox, inflammation, and endothelial function [J]. *Cell Signal*, 2023, 108: 110696.
- [7] ZUO Q, ZHANG G, HE L, et al. Canagliflozin attenuates hepatic steatosis and atherosclerosis progression in western diet-fed ApoE-knockout mice [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2022, 16: 4161-4177.
- [8] CHEN B, YE X, CHEN L, et al. A novel model of central precocious puberty disease: Paternal MKRN3 gene-modified rabbit [J]. *Anim Models Exp Med*, 2025, 8(3): 511-522.
- [9] LU R, YUAN T, WANG Y, et al. Spontaneous severe hypercholesterolemia and atherosclerosis lesions in rabbits with deficiency of low-density lipoprotein receptor (LDLR) on exon 7 [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 29-38.
- [10] NIIMI M, YANG D, KITAJIMA S, et al. ApoE knockout rabbits: a novel model for the study of human hyperlipidemia [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 245: 187-193.
- [11] 刘天平, 黎桂玲, 刘科, 等. FOXN1 基因敲除兔嵌合体的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(4): 35-40.
LIU T P, LI G L, LIU K, et al. Establishment of chimeric rabbits with FOXN1 gene knockout [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(4): 35-40.
- [12] 黎桂玲, 萨楚拉, 陈傍柱, 等. 基于 16S rRNA 基因测序探究 ApoE 基因敲除兔肠道微生物特征 [J]. *广东农业科学*, 2025, 52(7): 72-83.
LI G L, SA C L, CHEN B Z, et al. Exploring the intestinal microbiota characteristics in ApoE knockout rabbits based on 16S rRNA gene sequencing [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2025, 52(7): 72-83.
- [13] CHEN B, SA C, LI G, et al. Pregnancy and nursing management for embryo-transferred and genetically modified rabbits [J]. *J Vis Exp*,

- 2024(214): e67793.
- [14] DONG W, ZHANG F, LIAN D, et al. Efficacy and safety of Tai Chi for hyperlipidaemia: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2022, 12(9): e053867.
- [15] NAKASHIMA Y, PLUMP A S, RAINES E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(1): 133-140.
- [16] ABOU KHALIL Y, RABÈS J P, BOILEAU C, et al. APOE gene variants in primary dyslipidemia [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 328: 11-22.
- [17] ROTZIUS P, THAMS S, SOEHNLEIN O, et al. Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(1): 493-500.
- [18] DÖRING Y, SOEHNLEIN O, WEBER C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 736-743.
- [19] VALLEJO J, COCHAIN C, ZERNECKE A, et al. Heterogeneity of immune cells in human atherosclerosis revealed by scRNA-Seq [J]. *Cardiovasc Res*, 2021: cvab260.
- [20] MICHEL J B, MARTIN-VENTURA J L. Red blood cells and hemoglobin in human atherosclerosis and related arterial diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6756.
- [21] CHEN Y, FU W, ZHENG Y, et al. Galectin 3 enhances platelet aggregation and thrombosis *via* Dectin-1 activation: a translational study [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(37): 3556-3574.